



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUADRO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA
DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL EM COELHO-BRAVO

FÁBIO ALEXANDRE ABADE DOS SANTOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

COORDINADORA

Doutora Maria Margarida Nunes da
Rosa Dias Duarte

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUADRO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA
DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL EM COELHO-BRAVO

FÁBIO ALEXANDRE ABADE DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

COORIENTADORA

Doutora Maria Margarida Nunes da
Rosa Dias Duarte

2018

LISBOA

Se o caminho é fácil, não vou. Se não existe, eu construo.

Só preciso do barro. Eu fabrico os tijolos e ergo a casa.

(Fábio Abade dos Santos)



CIISA MIMV 15



Projeto “+Coelho: Avaliação Ecosystemática das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral” financiado pelo Fundo Florestal Permanente.

Agradecimentos

Apraz-me agradecer à minha Orientadora Professora Conceição Peleteiro, que dispensaria quaisquer palavras, mas que neste âmbito são imperiais. A pessoa mais acelerada e dinâmica que já conheci, mas que, ao mesmo tempo, foi capaz de se sentar comigo, com imensa vontade e satisfação, tardes inteiras, a ensinar-me e a ajudar-me, e tanto que tem para me ensinar.

À minha orientadora Doutora Margarida Duarte que me acolheu desde a primeira vez, com imensa humildade para comigo, quando ainda nem sabíamos que a nossa interação se estenderia a esta tese. A sua dedicação, organização, estabelecimento de objetivos e insatisfação saudável ensinaram-me a ser um melhor aluno e um melhor investigador. Melhor parceira de saídas de campo, nunca perdendo o sorriso e sentido de humor, mesmo após horas perdidos a andar de jipe pela falta de orientação espacial que partilhamos.

À Doutora Carina Carvalho, que sem dúvida merece que a refira como a minha terceira orientadora, e acho que isto diz tudo.

Ao Doutor Carlos Calvete (CIITA) com quem adoro discutir sobre o tema.

A um amigo, Sebastião Miguel, que conheci apenas no âmbito desta dissertação, mas que rapidamente se tornou um membro da minha família. Sem dúvida um dos meus orientadores da prática.

À Professora Isabel Fonseca (FMV), ao Doutor David Ramilo (FMV), e à Doutora Maria João Alves (INSA) por toda a celeridade nas diligências que foram necessárias à captura e identificação dos insetos, ixodídeos e dos roedores.

Aos grandes amigos que este trabalho me trouxe, especialmente Dr. Carlos Magro e Mário Gomes (Quinta dos Penedinhos), e a todos os outros do grupo “Recuperação do Coelho-Bravo” a quem, pelo elevado número (mais de 1800), não me é possível agradecer nominalmente, mas sem os quais este manuscrito não passaria de uma revisão bibliográfica.

Aos Professores Jorge Correia, Mário Pinho, Mário Quaresma, às Técnicas Maria do Rosário e Sandra Carvalho, ao Dr. Hugo Pissarra, aos Srs. Álvaro Mendes e Bruno Fortunato, bem como a todos os outros funcionários da FMV que sempre me ajudaram e com quem tive boas conversas nesta pequena grande casa.

Dr. Carlos Esteves do CITA, que nunca me negou uma resposta ou uma explicação. Que mesmo estando tão longe, sempre me respondeu mais rápido que qualquer outra pessoa, e sempre com imenso gosto.

À Nzytech, com especial cumprimento para o Dr. Diogo Comprido pela celeridade e prontidão que sempre me ajudou. À Werfen (na pessoa de Dr. Sérgio Calado) e AgPath (nas pessoas de Virgínia Marques e Sandra Adan) pela colaboração económica que prestaram nesta dissertação.

A todos os investigadores, funcionários, colegas e amigos do INIAV que me receberam com a melhor alegria desde o primeiro dia: Doutor Miguel Fevereiro, Diretor da UEISPSA do INIAV, e Dras Teresa Fagulha, Fernanda Ramos, Isabel Almeida, Margarida Henriques, Margarida Simões, Mónica Cunha e Ana Oliveira e ao Dr. Tiago Luís. À Janeca, à Fátima, Ana Cristina e Ferreira e aos estagiários do INIAV com que me cruzei (em especial à Marta que ajudou neste trabalho). A todos agradeço a forma com que me trataram, sempre calorosa.

Às minha grandes amigas Andreia Severino e Susana. Aos amigos que este curso me trouxe, Ritinha, Dianita, Saramago, Patrícia, Ana Cristina, Ana Rita, Joana, André, Vinagre e turma D, e a todos os outros que não posso aqui referir por duas razões: pelo número e pelo medo de me esquecer de algum. À minha família da Quinta do Caiado.

À Beatriz para quem as palavras nunca chegarão para descrever e agradecer o que de bom me trouxe à vida.

À minha verdadeira família; Pai, Mãe, Irmão e Irmã pelo apoio que me deram nestes 23 anos e em particular nestes últimos anos de percurso académico.

Agradeço o apoio financeiro que me foi concedido pelo CIISA-FMV (Projecto MIMV15) e pelo Projecto +Coelho financiado pelo Fundo Florestal Permanente (MAFDR).

Quadro anatomo-histopatológico e diagnóstico molecular da Doença Hemorrágica Viral em coelho-bravo

Resumo

O vírus da doença hemorrágica dos coelhos de tipo 2 (RHDV2) foi detetado em Portugal pela primeira vez, em 2012, e encontra-se atualmente disseminado em todo o território nacional incluindo Madeira, Açores e Berlengas. O papel ecológico e económico do coelho-bravo, aliado à sua importância para os níveis tróficos superiores, levou a que o Governo Português ativasse em 2017 um plano para controlo desta doença (Despacho 4757/2017 de 31 de Maio).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer padrões de lesão histopatológica nos principais órgãos afetados (fígado, pulmão, baço, duodeno, coração, entre outros) durante a infeção por RHDV2 e relacioná-los com os padrões de distribuição de cargas virais (medidos através dos valores de Cq obtidos por RT-qPCR) em sete matrizes (fígado, baço, duodeno, fezes, rim, pulmão e ventrículo esquerdo). Todos os coelhos-bravos investigados (n=49), foram obtidos no âmbito deste estudo, durante suspeitas de surtos de DHV, sendo oriundos de vários locais.

No grupo dos animais não vacinados, o diagnóstico virológico e histopatológico raramente suscitou dúvidas e não foram encontradas lesões macro e microscópicas diferentes entre os coelhos jovens e os animais adultos. No entanto foi observada uma diminuição significativa das cargas virais nos órgãos dos animais vacinados para RHDV2 quando comparados com os animais não vacinados, tal como já descrito na literatura. Em alguns animais vacinados, foi difícil detetar o vírus por métodos moleculares apesar da presença de graves lesões histopatológicas compatíveis com DHV. No caso dos animais vacinados, a valores de Cq tendencialmente maiores, correspondeu uma menor prevalência do padrão lesional hepático mais grave. Contrariamente, nos animais não vacinados, foram encontrados valores de Cq tendencialmente mais baixos no fígado (maiores cargas virais), correspondendo a um padrão lesional mais grave. Os dados obtidos indicam também que o fígado não é o órgão de eleição para diagnóstico de RHDV2 em animais vacinados, já que o pulmão foi a matriz onde o vírus foi mais detetado. Curiosamente, o ventrículo esquerdo apresentou-se como a matriz com maior percentagem de positividade em todos os grupos pelo que a pertinência da sua utilização sistemática no diagnóstico molecular, deve ser investigada. Foi ainda realizada a pesquisa de RHDV2 em outras espécies simpátricas: lebre ibérica (n=2), toirão (n=1), texugo (n=1), sacarrabos (n=1), roedores (n=18), pardal-comum (n=1), insetos (n> 2568) e ixodídeos (n=28)). Foi detetado RNA viral no pulmão de um toirão, no fígado e ventrículo esquerdo de uma lebre, nas fezes do pardal comum, e em 3 famílias de insetos (Ceratopogonidae, Staphylinidae e Simuliidae). Este trabalho trouxe novos dados para a compreensão da interface patogenia-diagnóstico e para a compreensão da eco-epidemiologia da DHV

Palavras – chave

RHDV2, coelho-bravo, *Oryctolagus cuniculus*

Anatomo-histopathological analysis and molecular diagnosis of Viral Haemorrhagic Disease in wild rabbit

Abstract

Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) was detected in Portugal for the first time in 2012. It is currently widespread in the continent and islands (Azores, Madeira and Berlengas). The ecological and economic role of the wild rabbit and its crucial importance for the higher trophic levels, led the Portuguese Government to activate, in 2017, an action plan to control this disease (Dispatch 4757/2017 of 31 May).

This work aimed to establish patterns of histopathological lesions in the organs affected during infection (liver, lung, spleen, thymus, duodenum, heart among others) and to relate them to the viral load distribution patterns, measured by the Cq values obtained with a RHDV2-specific RT-qPCR, in seven biological matrices (liver, spleen, duodenum, faeces, kidney, lung and left ventricle). All the wild rabbits investigated (n = 49) were obtained within the scope of this study and originated from several locations (mainly two wild-rabbit farms with management conditions and different purposes) during suspected outbreaks of haemorrhagic viral disease. In the group of unvaccinated animals, the virological and histopathological diagnosis rarely raised doubts and no different macro and microscopic lesions were found between young rabbits and adult animals

No differences in the macro and microscopic lesions were found between young and adult rabbits but a significant decrease in the viral loads of organs was observed in RHDV2 vaccinated rabbits, when compared to non-vaccinated rabbits, as described before in the literature. In some animals that had been vaccinated, it was difficult to detect the virus by molecular methods, although severe histopathological lesions were identified. For the vaccinated group, the increase in the Cq values tended to be accompanied by a more variable lesional pattern, with the more severe ones being less prevalent. In the liver of non-vaccinated rabbits, for example, as Cq values decreased (corresponding to higher viral charges), more severe lesional patterns were observed.

Our data indicate that the liver is not the organ of choice for RHDV2 molecular diagnosis in vaccinated animals, since the virus was more often detected in the lungs. Interestingly, the left ventricle showed the highest percentage of positivity in all groups, so the relevance of its systematic use for diagnosis should be considered and investigated. RHDV2 was also investigated in other sympatric species, such as Iberian hare (n=2), toad (n=1), badger (n=1), rodents (n=18), common sparrow (n=1), insects (n>2568) and ixodids (n=38). Viral RNA was detected in the lung of a toad, in the liver and heart of a hare in the faeces of the common sparrow, and in 3 families of insects (Ceratopogonidae, Staphylinidae and Simuliidae). This work brought new insights to the pathogeny-diagnosis interface and to the comprehension of the disease eco-epidemiology.

Key words

RHDV2, wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*

Índice Geral

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract.....	VII
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XV
Capítulo I – Revisão Bibliográfica	1
1. Coelho-bravo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	1
1.1 Distribuição e evolução	1
1.2. Reprodução.....	4
1.3. Habitat e Ecologia	5
1.4. Ameaças	7
2. Doença Hemorrágica Viral do Coelho.....	8
2.1. Agente etiológico e evolução espaço-temporal.....	9
2.2. Taxonomia viral	13
2.3. Características Moleculares do Virião	13
2.4. Genoma Viral	15
2.5. Filogenia viral	16
2.6. Ciclo viral	17
2.7. Fisiopatologia	18
2.8. Sinais clínicos e lesões anatomo-histopatológicas	21
2.9. Métodos de Diagnóstico.....	23
2.10. Preparação de amostras	24
2.11. Interpretação de resultados dos métodos moleculares	24
2.12. Transmissão e disseminação	26
2.13. Impactos social, económico e ambiental.....	30
2.14. Perspetivas de controlo da doença e do declínio do coelho	30
2.15. A DHV como modelo animal da Medicina Humana	32
Capítulo II - Materiais e Métodos.....	33
1. Origem dos animais. Critérios de inclusão e exclusão	33
2. Caracterização dos locais de origem da amostra	34
3. Critério de grupamento dos animais	38
4. Exames de necrópsia.....	39
5. Colheita para análise virológica.....	39
6. Colheita para análise histopatológica	40
7. Captura de roedores	40
8. Captura de insetos e sua identificação	41
9. Captura de ixodídeos e identificação	42
10. Preparação das amostras para os exames virológicos.....	42
11. Análise Virológica	43
12. Análise Estatística.....	45

Capítulo III – Resultados	46
1. Exames de necrópsia.....	46
2. Histopatologia	47
2.1. Padrões lesionais histopatológicos estabelecidos.....	47
2.2. Distribuição da frequência dos diferentes padrões histopatológicos	53
2.2.1. Animais infetados naturalmente	53
2.2.2. Animais infetados laboratorialmente	55
3. Resultados de Virologia.....	55
3.1. Estudo comparativo de 4 kits de RT-PCR	55
3.2. Resultados do RT-qPCR dos coelhos positivos	56
3.3. Resultados duvidosos do RT-qPCR	60
4. Resultado de RT-qPCR e lesões histopatológicas em lebres, mesocarnívoros, roedores e pardal-comum	61
5. Pesquisa de RHDV2 em insetos e ixodídeos	63
5.1. Resultados da captura na Quinta dos Penedinhos	63
5.2. Resultados da captura de insetos e ixodídeos na Herdade do Infantado	64
5.3. RT-qPCR dos ixodídeos.....	65
5.4. RT-qPCR dos insetos	65
6. Correlação entre os resultados da histopatologia e virologia.....	66
Capítulo IV – Discussão	68
1. Características dos surtos de mortalidade de coelhos-bravos por RHDV2 na Quinta dos Penedinhos	68
2. Os dados da necrópsia, e os exames histopatológicos e virológicos, não revelaram a presença de RHDV2 nos roedores capturados na Quinta dos Penedinhos	71
3. A ausência de deteção de RHDV2 por RT-qPCR nos insetos capturados na Quinta dos Penedinhos pode ter resultado duma amostragem tendenciosa	72
4. Características dos surtos de mortalidade de coelhos-bravos por RHDV2 na Herdade do Infantado	72
5. Os dados da necrópsia, e os exames histopatológicos e virológicos, não indicaram a circulação de RHDV2 em roedores capturados na Herdade do Infantado	73
6. Deteção de RNA RHDV2 num Pardal- comum (<i>Passer domesticus</i>), pode sugerir o papel de outras aves, para além das aves de presa, na disseminação do vírus	73
7. Deteção de RHDV2 por RT-qPCR em insetos capturados na da Herdade do Infantado ..	74
8. Deteção de RHDV2 em mesocarnívoro (Toirão)	75
9. Significado e interpretação dos resultados duvidosos ou negativos obtidos em alguns coelhos-bravos recolhidos, suspeitos de morte por DHV	75
10. As diferenças encontradas nos padrões entre os animais vacinados e não vacinados, sugerem uma progressão diferente da doença	79
Capítulo V – Conclusão.....	81
Anexos	102

Índice de Figuras

Figura 1– Mapa de Distribuição do <i>O. cuniculus</i> no mundo.	2
Figura 2 - Distribuição geográfica das duas subespécies de coelho-bravo na Península Ibérica.	3
Figura 3 – Cenários potenciais de conflitos entre caçador, conservacionista e agricultor.....	5
Figura 4 – Importância trófica do coelho-bravo.....	6
Figura 5 – Número relativo de coelhos ao longo do ano, antes e após a ocorrência de DHV..	9
Figura 6 – Fotografia de microscopia eletrônica do RHDV.....	14
Figura 7 – Organização genómica do RHDV.....	15
Figura 8 – Esquema do ciclo viral.....	18
Figura 9 – Ortofotomapa da Quinta dos Penedinhos.....	34
Figura 10 – Ortofotomapa da Herdade do Infantado, Samora Correia.	35
Figura 11– Armadilhas para captura de roedores; <i>Sherman e Live</i>	41
Figura 12 – Armadilha OVI com lâmpada de luz ultravioleta..	41
Figura 13 – Método de toalha turca para captura de ixodídeos.....	42
Figura 14 – Fígado - Padrão F#1 (H&E, 100x).....	50
Figura 15 – Fígado - Padrão F#2 (H&E, 100x).....	50
Figura 16 – Fígado - Padrão F#3 (H&E, 100x).....	50
Figura 17 – Fígado - Padrão F#4 (H&E, 100x).....	50
Figura 18 – Fígado - Padrão F#5 (H&E, 100x).....	50
Figura 19 – Fígado - Padrão F#6 (H&E, 100x).....	50
Figura 20 – Fígado - Padrão F#7 (H&E, 100x).....	51
Figura 21 – Pulmão - Padrão P#1 (H&E, 100x).....	51
Figura 22 – Pulmão - Padrão P#2 (H&E, 100x).....	51
Figura 23 – Pulmão - Padrão P#4 (H&E, 100x).....	51
Figura 24 – Traqueia - Padrão T#2 (H&E, 100x).....	51
Figura 25 – Traqueia - Padrão T#3 (H&E, 100x).....	51
Figura 26 – Traqueia - Padrão T#4 (H&E, 100x).....	52
Figura 27 – Coração - Padrão C#2 (H&E, 100x)	52
Figura 28 – Baço - Padrão B#3 (H&E, 100x)	52
Figura 29 – Baço - Padrão B#5 (H&E, 100x)	52
Figura 30 – Rim - Padrão R#1 (H&E, 40x).....	52
Figura 31 – Rim - Padrão R#3 (H&E, 100x).....	52
Figura 32 – Rim - Padrão R#4 (H&E, 100x).....	53
Figura 33 – Rim- Padrão R#5 (H&E, 40x).....	53

Figura 34 – Timo – Padrão TI#2. (H&E, 40x)	53
Figura 35 – Timo – Padrão TI#3. (H&E, 40x)	53
Figura 36 – Resultados do RT-qPCR para detecção de RHDV2 (Duarte <i>et al.</i> , 2015) obtidos com 4 kits comerciais..	56
Figura 37 –Resultado do RT-qPCR de um coelho vacinado, positivo para RDHV2.....	58
Figura 38 – Resultado do RT-qPCR de um coelho não vacinado positivo para RDHV2.....	59
Figura 39-Resultado do RT-qPCR para o RDHV2 para o ventrículo esquerdo e fígado de uma lebre	62
Figura 40 – Resultado do RT-qPCR para o RDHV2 para o pulmão e rim de um toirão.	62
Figura 41– Resultado do RT-qPCR para RHDV2 num pardal-comum, para a matriz fezes. ..	63
Figura 42 – Associação entre o valor de Cq e o padrão de lesão encontrados no fígado.....	67
Figura 43 – Associação entre o valor de Cq e o padrão de lesão encontrados no pulmão.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1- Últimos relatos de DHV em alguns países do mundo, reportados à Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE).	10
Tabela 2 - Principais lesões anatomo-histopatológicas encontradas na doença hemorrágica viral do coelho.	23
Tabela 3 - Caracterização dos locais mais significativos de origem da amostra: Quinta dos Penedinhos e a Herdade do Infantado.	36
Tabela 4 - Descrição da amostragem utilizada neste estudo (data de colheita, espécies, número de exemplares).	37
Tabela 5 – Grupos de coelhos-bravos de acordo com a origem geográfica e mortalidade correspondentes às amostragens representadas na Tabela 4.	38
Tabela 6 – Características dos oligómeros e sonda utilizados na técnica de RT-PCR em tempo real.	44
Tabela 7– Par de oligómeros utilizados para confirmação e posterior sequenciação do vírus de RHDV e RHDV2.....	45
Tabela 8– Resumo das alterações macroscópicas encontradas à necrópsia dos coelhos-bravos.	46
Tabela 9 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o fígado.	47
Tabela 10 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o pulmão.	47
Tabela 11– Padrões histopatológicos estabelecidos para o traqueia.	48
Tabela 12– Padrões histopatológicos estabelecidos para o intestino delgado.....	48
Tabela 13 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o coração.....	48
Tabela 14 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o baço.....	48
Tabela 15 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o estômago.....	48
Tabela 16 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o rim.....	49
Tabela 17 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o timo.	49
Tabela 18– Distribuição dos diferentes padrões lesionais nos órgãos analisados nos grupos de coelhos-bravos vacinados (VAC) e não-vacinados (NVAC) e análise comparativa da frequência de cada padrão entre os dois grupos.	54
Tabela 19 – Distribuição dos diferentes padrões de lesão histopatológica presentes em coelhos infectados laboratorialmente com RHDV2/b ou RHDV.....	55
Tabela 20 – Resultados de RT-qPCR dos coelhos positivos e duvidosos ($C_q < 38,00$).	57
Tabela 21 – Valores de C_q encontrados nas diferentes matrizes dos animais vacinados (VAC; $n=21$).....	58

Tabela 22 – Valores de Cq presentes nas diferentes matrizes dos animais não-vacinados (NVAC; n=15).	59
Tabela 23 – Valores de Cq presentes nas diferentes matrizes entre os grupos de coelhos-bravos VAC e NVAC.	60
Tabela 24 – Comparação da positividade das matrizes entre os grupos de coelhos-bravos VAC e NVAC.	60
Tabela 25 – Frequência de valor de Cq < 38,00 das matrizes nos coelhos-bravos duvidosos (DUV).	61
Tabela 26 – Comparação dos valores de Cq obtidos no RT-qPCR das diferentes matrizes dos coelhos-bravos DUV.	61
Tabela 27 – Classificação taxonómica e número dos insetos capturados na Quinta dos Penedinhos.	63
Tabela 28 - Classificação taxonómica e número dos insetos e ixodídeos capturados na Herdade do Infantado.	64
Tabela 29 – Classificação taxonómica dos insetos capturados na Herdade do Infantado, em cujos <i>pools</i> foi detetado RNA de RHDV2.	66

Lista de Abreviaturas

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BRC – *British Rabbit Council*

Buc – localidade de Bucelas

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CIITA – Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria

Cq – *Cycle of quantification*

DHV – Doença Hemorrágica Viral

DUV - coelhos com resultado duvidoso a RHDV2 no RT-qPCR

EBHSV - *European brown hare syndrome virus*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

gRNA – ácido ribonucleico genómico

H&E – hematoxilina e eosina

HI – Herdade do Infantado

HR – humidade relativa

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IgG – Imunoglobulina G

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Lou – localidade de Loures

LPC – *Lapinized Philippines Coronel*

MAb – *Monoclonal antibody*

MRCV - *Michigan rabbit calicivirus*

NEG – coelhos negativos a RHDV2 no RT-qPCR

NP-RCV-Non-pathogenic rabbit calicivirus

NVAC – animais não vacinados para RHDV2

O. c. a. – *Oryctolagus cuniculus algirus*

O. c. c. – *Oryctolagus cuniculus cuniculus*

ORF – *open reading frame*

PBS – *phosphate buffered saline*

PCR – *polymerase chain reaction*

Plg – localidade de Portalegre

POS – coelhos positivos a RHDV2 no RT-qPCR

Prec – precipitação

QP – Quinta dos Penedinhos

RCV – *Rabbit Calicivirus*

RdRp – *RNA-dependent RNA polymerase*

RHDV – *Rabbit haemorrhagic disease virus (genogroups G1 to G6)*

RHDVa- *Rabbit haemorrhagic disease virus (genogroup G6)*

RHDV2 – *Rabbit haemorrhagic disease virus 2* (também descrito como RHDVb, nova variante e GI.2)

RNA – *ribonucleic acid*

RT-PCR - *reverse transcription-polymerase chain reaction*

RT-qPCR – *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*

SAS – sem alterações significativas

sgRNA – *subgenomic ribonucleic acid*

V – velocidade (do vento)

VAC – coelhos vacinados para RHDV2

VLP – *virus-like particles*

vp60 – gene que codifica a VP60

VP60 – proteína estrutural maioritária da cápside (60 Kda)

Vpg – viral *protein genome-linked*

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

1. Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*)

O coelho-bravo europeu, *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) é um pequeno mamífero pertencente à família *Leporidae* e à ordem dos Lagomorfos. Apresenta um comprimento cabeça-corpo de 34-50 cm (Macdonald & Barrett, 1993) e pelagem com uma coloração variável dentro do pardo-grisalho, com tons amarelados nas partes occipitais e nas patas, ventre esbranquiçado, cauda curta cuja parte interna está coberta por pelo branco, olhos laterais de cor negra, membros posteriores mais desenvolvidas que os dianteiros, permitindo-lhe uma corrida aos saltos e zigzagues e orelhas compridas embora menores que as do género *Lepus* (La Fuente, 1993; Gálvez-Bravo, 2017).

É uma espécie originária da Península Ibérica, chave no ecossistema mediterrânico, sendo o sul de Espanha considerado o local geográfico mais provável para a sua origem (Ferrand & Branco, 2007) pela descoberta de registos fósseis na região de Granada (Andaluzia, Espanha). Estes datam de há 2,5 milhões de anos (Lopez-Martinez, 1989, 2008; Monnerot et al., 1994; Ferrand & Branco, 2007) e testemunham a coexistência de duas subespécies: *Oryctolagus cuniculus algirus* (*O. c. a.*) e *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (*O. c. c.*). O *O. c. a.* encontra-se relativamente restrito à região sudoeste da Península Ibérica e o *O. c. c.* um pouco distribuído pelo mundo principalmente por ação antropogénica (Ferrand, 2008a).

Em 2008, foi classificado pelo *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) na categoria global de “quase ameaçado” (*Near-Threatened*) na Europa (Smith & Boyer, 2008), perdendo o estatuto de “pouco preocupante” que detinha em 1996. As populações de *Oryctolagus cuniculus* sofreram um declínio estimado em 95% desde 1950 na Europa, tendo decrescido cerca de 80% no caso particular de Espanha desde 1975 (Delibes, Rodríguez & Ferreras, 2000), devido a doença, perda de habitat e mortalidade de origem antropogénica (Ward, 2005). Figura atualmente no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral, 2005) e Espanha (Ferreira, 2012).

1.1 Distribuição e evolução

Em Portugal, o coelho foi outrora o mamífero mais abundante nos vales concheiros mesolíticos do Tejo e Sado (Lentacker, 1986; Arnaud, 1987) e foram encontrados vestígios ósseos de coelhos datados da segunda metade do 4º milénio A.C. (Leisner, 1983; Ferrand & Branco, 2007).

A expansão geográfica do *O. cuniculus* foi uma das mais notórias expansões de mamíferos (Ferrand & Branco, 2007) de que há memória. A distribuição original após a última Era glacial (há cerca de 8 mil anos), incluía a região compreendida entre a Península Ibérica até à França ocidental e norte de África, tendo ocorrido a introdução na Europa ocidental no período romano (Gibb & Williams, 1990; Mitchell-Jones et al., 1999). A idade média representou a época mais importante para a expansão geográfica do coelho-bravo (Callou, 1995). Esta espécie é nativa na Argélia, França, Gibraltar, Marrocos, Portugal e Espanha e foi introduzida em numerosos países entre os quais a Albânia, Argentina, Austrália, Áustria, Bélgica, Bulgária, Chile, República Checa, Dinamarca, Ilhas Malvinas, Alemanha, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Namíbia, Holanda, Nova Zelândia, Noruega, Polónia, Roménia, Rússia, Eslováquia, Eslovénia, África do Sul, Suíça, Suécia, Reino Unido e Estados Unidos da América (Figura 1) (Smith & Boyer, 2008), ilhas mediterrânicas de Sicília, Córseica, Sardenha, Creta e ilhas Baleares (Thompson & King, 1994), Croácia e Eslováquia (Mitchell-Jones et al., 1999).



Figura 1– Mapa de Distribuição do *O. cuniculus* no mundo. A amarelo encontram-se assinalada a distribuição autóctone e a lilás a distribuição resultante da introdução antropogénica. [*Oryctolagus cuniculus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-2].

O coelho-bravo foi introduzido na Austrália em 1788 e reintroduzido em 1859 onde neste momento é considerado uma praga (Thompson & King, 1994). Foram realizadas numerosas tentativas de introdução desde meados do século XIX na América do Sul. Aquelas tiveram sucesso em 1936, mantendo-se o coelho na Argentina e Chile (Thompson & King, 1994). Estão presentes em várias ilhas do Pacífico, costa Africana, Nova Zelândia e Caribe (Thompson &

King, 1994). A espécie *Oryctolagus cuniculus* é presentemente encontrada sempre abaixo dos 1,500 m de altitude (John, Sharples & Bell, 1999). Na Península Ibérica existem duas subespécies (referidas anteriormente) com características morfológicas e genéticas distintas, maioritariamente distribuídas em duas regiões. A nordeste da Península Ibérica encontramos a subespécie *O. c. c.* e a sudoeste a subespécie *O. c. a.* (Figura 2), incluindo as ilhas da Madeira, Açores e Canárias (Ferrand, 2008b). A região central da Península Ibérica é uma zona caracterizada pela presença de animais híbridos das duas subespécies (Figura 2).

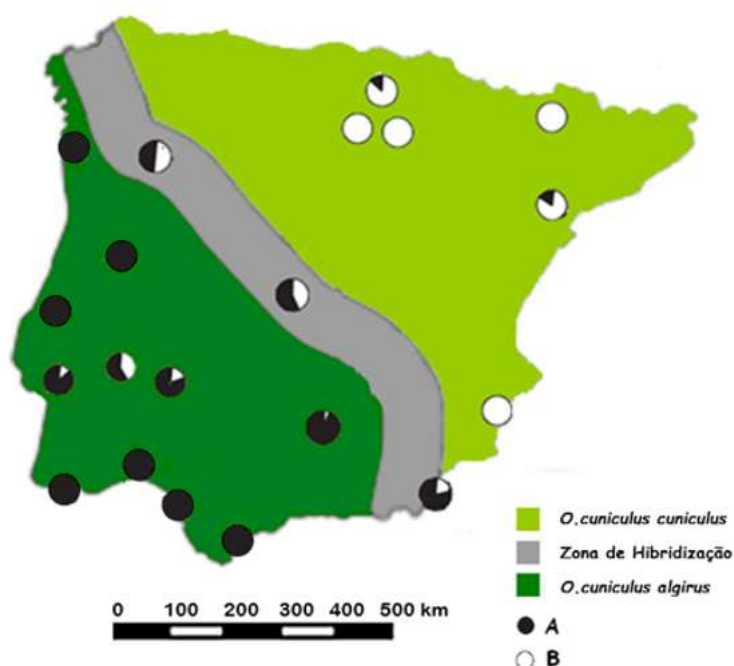


Figura 2 - Distribuição geográfica das duas subespécies de coelho-bravo na Península Ibérica. Esta distribuição foi estabelecida por pesquisa das linhagens mitocondriais das suas subespécies. As linhagens mitocondriais A e B, são respetivamente, originárias das subespécies *O. c. a.* e *O. c. c.* (Adaptado de Branco, Ferrand, & Monnerot, 2000; Rafael Villafuerte et al., 2017)

A subespécie *O. c. c.* esteve na origem do coelho doméstico e foi distribuída a partir da Península Ibérica para o resto da Europa, parte da América do Sul, Austrália e Nova Zelândia (Ferrand, 2008a). A subespécie *O. c. a.*, por sua vez, apresenta uma menor área de dispersão, podendo ser encontrada na Macaronésia e no Norte de África, para além da área já referida (Ferrand, 2008a). Ambas as subespécies apresentam uma coloração parda, cinzento a castanho mas a subespécie *O. c. a.* é mais pequena, com os adultos apresentando um peso médio de 1.1 kg e máximo de 1.4 kg (Soriguer, 1980; Ferreira & Ferreira, 2014), e na subespécie *O. c. c.* um peso máximo de 2 kg (Gibb, 1990). Para além das diferenças de tamanho, estas duas subespécies diferem ainda em algumas características reprodutivas, nomeadamente o peso das

gónadas, a produção diária de espermatozóides, as dimensões dos corpos lúteos e o tamanho das ninhadas, que apresentam valores inferiores na subespécie *O. c. a.* (Gonçalves, Alves & Rocha., 2002).

Desde 2005, as populações na Península Ibérica decresceram a menos de 5% dos números de 1950, baseado nas populações do Parque Nacional de Donana, uma área protegida (Delibes et al., 2000). Em Portugal foi registada uma redução de 24% entre 1995 e 2002 (Ferreira & Alves, 2002). Na zona mediterrânica, particularmente na Península Ibérica, a distribuição e abundância das populações é altamente variável, entre habitats, ao longo do ano e entre diferentes anos (Virgós, Cabezas-Díaz, Malo, Lozano & López-Huertas, 2003; Calvete & Estrada, 2004; Calvete, 2006).

1.2. Reprodução

O coelho-bravo é capaz de se reproduzir oportunisticamente em qualquer época do ano, justificando-se assim o seu sucesso como colonizador (Gibb, 1990). Apresenta prolificidade de 2 a 7 láparos (inferior à dos coelhos domésticos), que deixam a toca com cerca de um mês de idade (Gibb & Williams, 1990) e apresenta maturidade sexual muito precoce (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas [ICNF], 2005). A fêmea atinge a maturidade sexual com cerca de 3,5 meses de idade e o macho aos 4 meses e podem viver até 9 anos (Macdonald & Barrett, 2002). A fêmea pode reproduzir-se com menos de 1 ano de idade (pouco comum nos outros lagomorfos), sendo no entanto condicionada pelo clima e disponibilidade de recursos (Bell & Webb, 1991), não só em quantidade absoluta mas principalmente pela disponibilidade de alimento de alta qualidade (Villafuerte, Lazo & Moreno., 1997). Apresenta uma gestação de 28 a 30 dias (Neves, n.d.). A época reprodutiva tem início em novembro e pode estender-se até junho com um pico em março/abril (Gonçalves et al., 2002).

A elevada prolificidade e fácil adaptação desta espécie leva a que, em algumas situações, se torne uma praga, tendo impacto negativo principalmente na agricultura, tal como acontece em Inglaterra, na Nova Zelândia e Austrália (Gibb et al., 1969). Cerca de 75%-80% dos juvenis são mortos por predadores antes de abandonarem as tocas, ou até estabelecerem um território próprio (Gibb, 1990; JA & Flux, 1990; Angulo, 2004). Nos adultos, a taxa de mortalidade pode variar de 20 a 80% por ano (Gibb, 1990; Calvete et al., 2005)

Atualmente, existe um conflito na Península Ibérica envolvendo conservacionistas, caçadores e agricultores quanto ao estado populacional e necessidade de intervenção populacional no coelho-bravo (Delibes-Mateos et al., 2014), atendendo aos diferentes interesses e ideias de cada um destes grupos envolvidos (Figura 3).

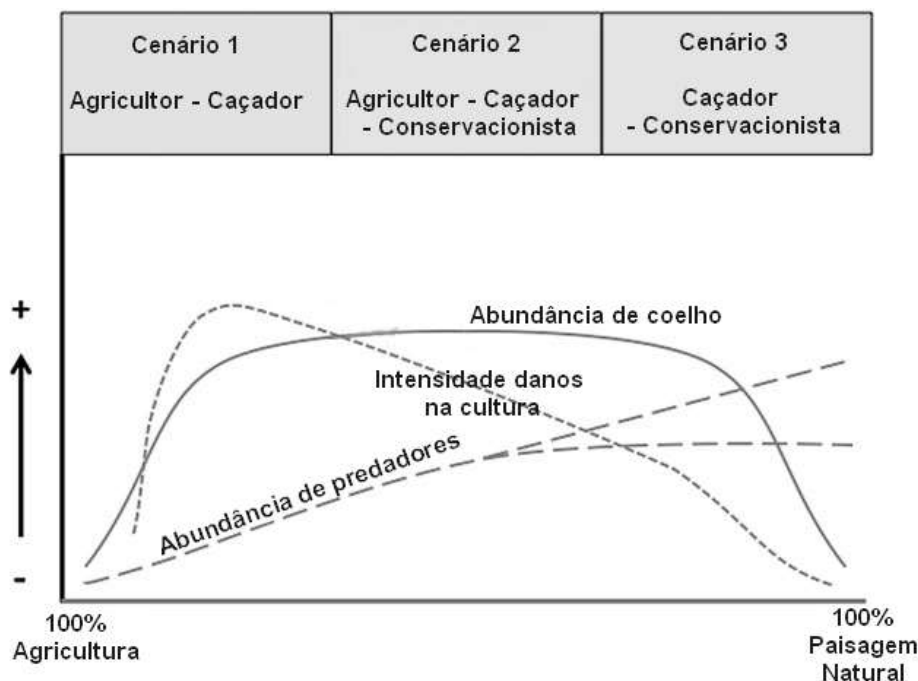


Figura 3 – Cenários potenciais de conflitos entre caçador, conservacionista e agricultor. Adaptado de Delibes-Mateos, Ferreira, Rouco, Villafuerte & Barrio (2014).

1.3. Habitat e Ecologia

O coelho-bravo, herbívoro, tem preferência por gramíneas em início de crescimento, sendo no entanto bastante tolerante a mudanças da vegetação existente (Ward, 2005), e por um habitat misto de arvoredos e plantas arbóreas, com pelo menos 40% de cobertura, para proteção contra predadores, intercaladas em mosaico com áreas abertas de pastoreio com erva e cereais, sendo a abundância de alimento e a pressão dos predadores os dois critérios determinantes na escolha de habitat para os coelhos (Thompson & King, 1994; Ward, 2005; Dellafiore et al., 2014). Prefere solos de terras arenosas que permitam a construção das tocas, mas escondem-se muitas vezes em zonas rochosas, embora estas zonas, pela sua localização acima do solo, aumentem o risco de predação. Têm hábitos crepusculares e noturnos (ICNF, 2005) embora, em locais com pouca pressão humana, possam ser vistos a qualquer hora do dia (Neves, n.d.).

O coelho tem um lugar importante na modulação do habitat, pela sua atividade de escavação, ingestão de plantas e fertilização, facilitando o crescimento da vegetação típica da Península Ibérica (Virgós, Cabezas-Díaz & Lozano, 2005), bem como fornecendo condições alimentares e de habitat para inúmeras espécies de invertebrados (Delibes-Mateos, Delibes, Ferreras &

Villafuerte., 2008). É uma espécie gregária que vive em grupos familiares (Biadi & Le Gall, 1993) de dois a dez indivíduos adultos (Neves, n.d.), que juntos formam uma colônia fisicamente separada de outras colônias, existindo em cada uma um macho dominante que fertiliza a quase totalidade das fêmeas, e uma fêmea dominante que pare na toca principal e em função da qual a reprodução é sincronizada (Neves, n.d.). Nos ecossistemas onde é autóctone, o coelho-bravo constitui uma espécie-chave com impacto muito superior ao da sua biomassa (Power et al., 1996), integrando a dieta de mais de 19 espécies nidificantes de aves de rapina diurnas e noturnas e de mais de 10 espécies de mamíferos carnívoros (Figura 4) (Delibes & Hiraldo, 1981; Delibes-Mateos, Redpath, Angulo, Ferreras & Villafuerte, 2007).



Figura 4 – Importância trófica do coelho-bravo. Encontram-se representadas as espécies para as quais o coelho-bravo representa uma maior percentagem de incorporação na dieta (assinalada sob o nome científico da espécie). A vermelho é apresentado o estatuto de conservação das espécies de acordo com o IUCN. Fonte: este documento & Cunha Gonçalves (2015). NT- *Near Threatened* (quase ameaçada), LC- *Least Concern* (pouco preocupante), EN- *Endangered* (ameaçada); VU- *Vulnerable* (vulnerável).

O declínio do *O. cuniculus* tem sido diretamente associado ao declínio do lince ibérico (*Lynx pardinus*) e da águia-imperial (*Aquila adalberti*) (Zofio & Vega, 2000). Neste âmbito, a extinção do coelho-bravo, ou o seu desaparecimento local, produz um efeito em cascata

catastrófico alterando toda a dinâmica de predador-presa (Smith, Sax & Lafferty., 2006; Delibes-Mateos et al., 2007).

1.4. Ameaças

A deterioração e fragmentação do habitat, a par das doenças víricas e da prosperação de predadores, desempenharam um papel determinante no declínio das populações de coelho-bravo (Trout & Tittensor, 1989; Moreno & Villafuerte, 1995; Ward, 2005; Ferreira & Alves, 2009). A agricultura intensiva, por deteriorar e fragmentar o habitat, bem como pelos efeitos que apresenta em toda a fauna e flora, tem um impacto negativo muito superior à agricultura tradicional (Delibes et al., 2000).

A produção pecuária intensiva contribui também para a degradação do habitat e competição por recursos. A terra não utilizada para cultivo é rapidamente transformada em florestas cerradas o que não constitui um habitat favorável para o coelho (Ward, 2005). As plantações arborícolas em Espanha e Portugal substituíram em muitas situações o habitat tradicional do coelho e dos seus predadores e constituem um perigo real de incêndio (Ward, 2005). As alterações climáticas, e a própria urbanização, apresentam uma ameaça (Ward, 2005) e, a par da caça insustentável, contribuem também para o declínio a longo prazo (Ferreira & Delibes-Mateos, 2010).

Apesar de todas as ameaças de origem territorial, alimentar e predatória, as doenças epizoóticas assumiram, a partir da segunda metade do século XX, o papel principal na deterioração das populações de coelho selvagem (Monnerot et al., 1994), nomeadamente a Doença Hemorrágica Viral (DHV) (Liu, Xue, Pu & Qian, 1984) e a Mixomatose (Aragão, 1927; Fenner & Ratcliffe, 1965), sendo a DHV a causa de extinções locais do coelho-bravo (Ferreira & Alves, 2009).

A mixomatose apresenta como agente etiológico um *Poxvirus* com origem na América do Sul, principalmente transmitido por vetores artrópodes (mosquitos e pulgas) introduzido intencionalmente por um agricultor em 1950 em França com o intuito de controlar as populações selvagens excessivas de coelho (Angulo & Cooke, 2002). Ocorreu uma mortalidade estimada em 90% do coelho-bravo desde 1950 (Virgós et al., 2005), verificando-se depois uma recuperação das populações por selecção de estirpes de menor virulência. Após instalação dos sinais (fase sintomática), a morte surge em média em 13 dias (Ward, 2005). Os animais afetados são mais suscetíveis à captura pelos predadores (Villafuerte, Calvete, Blanco & Lucientes, 1995). Os surtos de mixomatose ocorrem com um pico no início do verão (Angulo, 2004).

A caça em regiões onde as populações continuam reduzidas constitui atualmente uma ameaça adicional porque as populações já não têm capacidade para recuperar em condições normais. A caça apresenta também uma ameaça indireta por eliminar animais que apresentam resistência

às doenças (Delibes et al., 2000). A libertação ilegal de vírus modificados pode vir a constituir um grave risco para as populações frágeis que ainda resistem (Ward, 2005). Embora os predadores quando em população desregulada, constituam também uma ameaça, apresentam em contrapartida um papel sanitário essencial ao capturarem e eliminarem do ambiente os indivíduos doentes (Aguado, 2003).

2. Doença Hemorrágica Viral do Coelho

A DHV tem como agente etiológico um Calivírus que surgiu na Europa no fim da década de 80, causando inicialmente uma mortalidade de 55-75% dos coelhos na Península Ibérica (Villafuerte et al., 1995). Apesar das particularidades genéticas que distinguem as duas subespécies (*O. c. a.* e *O. c. c.*) (Ferrand, 2008a), ambas são altamente suscetíveis à doença (Muller et al., 2009), embora a DHV apresente maior relevância no caso do *O. c. a.* pela sua distribuição restrita à Península Ibérica. A taxonomia para os nomes e abreviaturas dos vírus, utilizadas neste documento, estão de acordo com o estabelecido em 2017 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*.

A DHV geralmente suprime as populações de coelho durante a época reprodutiva (Mutze et al., 2002). Contudo, a doença diminui a sua prevalência no verão, permitindo que as últimas crias a nascer, em outubro e novembro, tenham maior probabilidade de sobreviver porque permanecem protegidas pelos anticorpos maternos até ao fim do surto de DHV (final de novembro ou início de dezembro). Este número mais reduzido de juvenis, leva a uma menor competição pelo alimento ocorrendo um recrutamento compensatório. Deste fenómeno resulta que se verifique uma população crescente no verão (que na Austrália, local onde foi realizado o estudo, decorre de Dezembro a Fevereiro), ainda que, inferior à existente antes do surto de DHV (Figura 5) (Mutze et al., 2002).

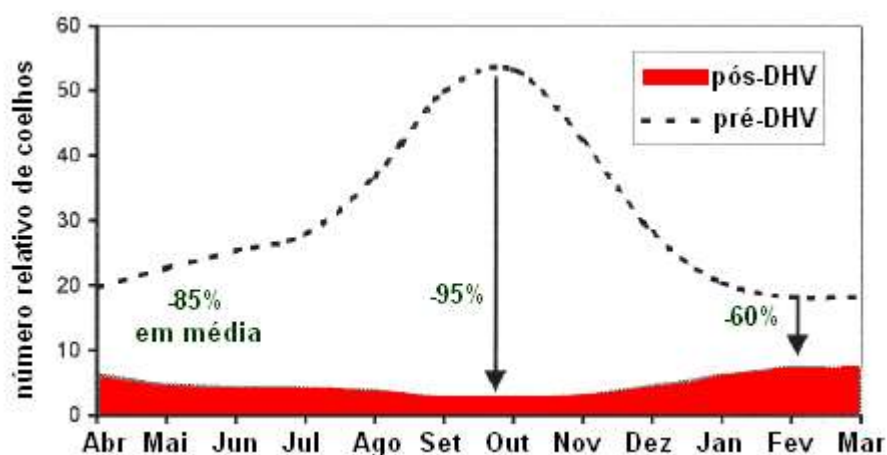


Figura 5 – Número relativo de coelhos ao longo do ano, antes e após a ocorrência de DHV. Adaptado de Mutze et al. (2002).

A morte sobrevém tipicamente 24h após o início dos sinais com um período de incubação inferior a 48h, podendo ser de apenas algumas horas (Liu et al., 1984; Xu, Chen, Chen & Yu, 1985; Villafuerte et al., 1995). A doença causada pelo vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (*rabbit haemorrhagic disease virus* - RHDV), tipicamente surge cerca de um mês após o início da época de reprodução (Mutze et al., 2002), e apresenta maior prevalência no fim do inverno e na primavera (Angulo, 2004). O aquecimento global pode aumentar a incidência da doença por levar a um clima seco e quente na Península Ibérica (Ward, 2005).

2.1. Agente etiológico e evolução espaço-temporal

A DHV foi descrita pela primeira vez, na cidade de Wuxi, na província de Jiangsu da China, em 1984, em coelhos domésticos Angora importados da República Democrática da Alemanha (Liu et al., 1984), tendo como agente etiológico o RHDV. Depois, disseminou-se por uma área de aproximadamente 50,000 km², levando à morte de 140 milhões de coelhos domésticos na China em menos de 1 ano (Liu et al., 1984; Xu, 1991). Daqui, expandiu-se através do comércio de coelhos infetados, ou produtos destes, para a Coreia (Park et al., 1987) e para a Europa, onde foi detetada pela primeira vez na Itália, em 1986 (Cancellotti & Renzi, 1991).

A partir de então, espalhou-se rapidamente ao resto da Europa, tornando-se endémica em muitos países (Abrantes et al., 2012b). Na Península Ibérica foi reportada pela primeira vez em 1988, tanto em Espanha (Argüello et al., 1988) como na ilha da Madeira e, subsequentemente, no Arquipélago de Açores (1988 no Faial, 1989 em São Jorge, e 1990 em Santa Maria) (revisão em Duarte et al., 2014) e em Portugal continental (Anónimos, 1989), levando a uma redução dramática das populações selvagens (Delibes-Mateos et al., 2007).

Em 1989, foi também detetada na Índia (Morisse et al., 1991), em 2000, na América do Norte (McIntosh et al., 2007) e em muitas outras regiões do globo como Cuba e Uruguai em 2007 (Farnós et al., 2007; McIntosh et al., 2007). Durante este período, ocorreram surtos da doença no Norte de África (Morisse, Le Gall & Boilletot, 1991). Na América do Sul, a doença foi detetada em 1988 no México, após a importação de produtos de coelhos da China (Gregg, House, Meyer & Berninger, 1991), tendo o último caso sido reportado em 1992 (Gregg et al., 1991). Este exemplo de erradicação, único no mundo, pode estar relacionado com a ausência de populações selvagens de *Oryctolagus cuniculus* neste país (Abrantes et al., 2012b).

Tabela 1- Últimos relatos de DHV em alguns países do mundo, reportados à Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE).

País	Último relato	Dom	Selv	País	Último relato	Dom	Selv
Holanda	1S, 2017		✓	Polónia	2S, 2016	✓	
Austrália	1S, 2017	✓	✓	Portugal	2S, 2016	✓	✓
Benim	2S, 2016	✓		Reunião	2S, 2016	✓	
Chipre	2S, 2016	✓		Espanha	1S, 2017	✓	✓
Rep. Checa	2S, 2016	✓		Suécia	2S, 2016	✓	✓
Dinamarca	1S, 2017	✓	✓	Suíça	1S, 2017	✓	
França	2S, 2016	✓	✓	Reino Unido	1S, 2017	✓	✓
Alemanha	1S, 2017	✓		China	1S, 2016		
Irlanda	1S, 2017	✓	✓	Coreia	2S, 2016		
Malta	2S, 2016	✓	✓	Palestina	1S, 2017		
Nova Zelândia	1S, 2017	✓	✓	Rússia	2S, 2016		
Hungria*	2S, 2016		✓	Itália*	2S, 2016	✓	
Costa do Marfim*	2S, 2016	✓	✓	Noruega*	1S, 2017	✓	

Dom: coelho doméstico; Selv: coelho-bravo; 1S – 1º semestre; 2S – 2º semestre; *Doença foi apenas relatada numa região do país.

Disponível em <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist>; acedido a 15 de Janeiro de 2018. Uma lista completa de todos os países no mundo, incluindo os relatos desde 2005 encontra-se disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines>

Na América do Norte, ocorreu o primeiro surto em 2000, no estado de Iowa (Anonymous, 2000). Foram ainda reportados surtos em Cuba, na Ilha da Reunião e Uruguai (Le Gall-Reculé et al., 2003; Farnós et al., 2007). Nota-se uma tendência para a endemicidade em locais onde as populações de coelho-bravo estão historicamente presentes (Abrantes et al., 2012b). Por outro lado ocorre de forma epidémica ou em surtos raros em zonas onde as populações

domésticas e/ou industriais predominam (Abrantes et al., 2012b). Análises filogenéticas recentes sugerem que o RHDV patogénico poderá ter-se desenvolvido décadas antes do seu primeiro relato e aparecimento na China (Duffy et al., 2009; Kerr, Kitchen & Holmes., 2009). A DHV (causada pelo RHDV1) foi testada, através de testes de suscetibilidade de hospedeiro, em cerca de 30 espécies de vertebrados tendo apenas sido possível induzir doença na espécie *Oryctolagus cuniculus* (Šmíd, Valíček, Rodák, Štěpánek & Jurák, 1991). Contudo, outras espécies foram identificadas como potenciais vetores disseminadores de vírus ou como hospedeiro reservatório e a seroconversão foi verificada em espécies que não o coelho (Leighton, Artois, Capucci, Gavier-Widén & Morisse., 1995; Merchán et al., 2011). No entanto, o RHDV clássico foi detetado em lebres ibéricas selvagens (*Lepus granatensis*) que tinham sido encontradas mortas durante um surto na década de 1990 (Lopes et al., 2014b). O *rabbit haemorrhagic disease virus 2* (RHDV2) foi identificado na lebre sarda (*Lepus capensis* var. *mediterraneus*), lebre-italiana ou lebre-da-Córsega (*Lepus corsicanus*) (Camarda et al., 2014) e Lebre-europeia (*Lepus europeus*) (Hall et al., 2017). Os trabalhos de Camarda et al. (2014) permitiram inferir que a virulência do RHDV2 é reduzida na *L. corsicanus* quando comparada com o *O. cuniculus*. Assim, o nível de suscetibilidade da *L. corsicanus* deve ser intermédio entre a *L. capensis mediterraneus*, na qual a difusão e severidade da doença é semelhante ao coelho-bravo, e a *Lepus europeus*.

Em agosto de 2010, um caso atípico de DHV foi reportado numa cunicultura no norte de França. Cerca de 25% dos animais vacinados para RHDV morreram bem como uma grande percentagem dos não vacinados (Le Gall-Recule et al., 2011). Alguns casos semelhantes foram subsequentemente relatados tendo o número aumentado acentuadamente no noroeste da França a partir de outubro de 2010. Durante este período foram registados também surtos nas populações selvagens. As lesões macroscópicas e microscópicas foram típicas da DHV (Le Gall-Recule et al., 2011). O vírus mostrou ser geneticamente relacionado, mas distante dos isolados de RHDV. A relação filogenética estabelecida com os lagovírus patogénicos e não patogénicos através da sequência parcial de nucleótidos do gene da proteína VP60 da cápside (354 pb) sugeriram tratar-se de um novo grupo genético (Le Gall-Recule et al., 2011). Este novo grupo, inicialmente descrito como nova variante, recebeu a denominação de RHDV2 ou de RHDVb, e foi subsequentemente identificado em Itália, em julho de 2011, numa cunicultura da província de Udine (Organização Mundial de Sanidade Animal [OIE], 2011).

O RHDV2 foi reportado em Itália e Espanha em 2011 (Dalton et al., 2012; Le Gall-Reculé et al., 2013) e seguidamente em 2012 em Portugal (Abrantes et al., 2013). Este vírus é genética e antigenicamente distinto do RHDV não sendo a imunidade conferida pelo contacto com o RHDV, protetora para o RHDV2 (Le Gall-Recule et al., 2011; Dalton et al., 2012). O RHDV2

disseminou-se rapidamente nas populações de coelho doméstico da Europa (Le Gall-Reculé et al., 2013) e substituiu o RHDV em circulação (Lopes et al., 2014a), provavelmente devido à sua capacidade de resistir à imunidade para o RHDV.

Em 2013, foi reportado no Reino Unido (Westcott et al., 2014) e na Escócia (Baily, Dagleish, Graham, Maley & Rocchi., 2014). No arquipélago dos Açores, foi reportado em diversas ilhas, em 2015 (M. Duarte et al., 2015). Neste ano foi também reportado na Austrália (Hall et al., 2015) e ilha de Tenerife (Martin-Alonso et al., 2016), e no ano seguinte na Finlândia (OIE, 2016) e no arquipélago das Berlengas (Abade dos Santos et al., 2017). No final de 2016, a doença foi também detetada no arquipélago da Madeira (Carvalho et al., 2017). A DHV é atualmente considerada endémica na maior parte dos países da Europa, Ásia e em algumas áreas do Norte de África (Tabela 1) (Abrantes et al., 2012b).

Le Gall-Reculé et al. (2013) descreveu o RHDV2 como menos virulento que os genogrupos G1-G5 e G6. Capucci, Cavadini, Schiavitto, Lombardi & Lavazza (2017) fizeram pela primeira vez uma avaliação da virulência do RHDV2 após 2011 e mostraram que as estirpes de RHDV2 isoladas em 2014 e 2015 em Itália levaram a uma taxa de mortalidade superior a 80% o que se aproxima da mortalidade habitualmente induzida pelo RHDV sendo superior em 4 vezes à mortalidade relatada para o RHDV2 por Le Gall-Reculé et al. (2013). Capucci et al. (2017) tem observado vários surtos naturais de RHDV2 em coelhos de produção caracterizados por altas taxas de mortalidade e conclui que estirpes de RHDV2 de maior patogenicidade se têm tornado mais prevalentes no campo.

Este aumento significativo na patogenicidade em apenas alguns anos suporta duas hipóteses (Capucci et al., 2017). A primeira, proposta por Elsworth et al. (2014) explica a evolução do vírus no coelho-bravo na Austrália propondo que novas estirpes de alta patogenecidade e virulência possam ser evolutivamente seleccionadas de modo positivo, permitindo a sua rápida disseminação e manutenção nas populações. A segunda hipótese, proposta por Le Gall-Reculé et al. (2013), descreve o RHDV2 como um novo vírus emergente e não como um vírus derivado do RHDV.

Os estudos epidemiológicos mostraram que os primeiros casos documentados de DHV por RHDV2 ocorreram em França, em abril e maio de 2010, respetivamente, numa cunicultura industrial e numa população selvagem (Le Gall-Reculé et al., 2013). A virulência moderada do RHDV2 é provavelmente uma vantagem evolutiva e pode explicar a sua habilidade para substituir o RHDV altamente patogénico nas populações selvagens. Este acontecimento tinha sido predito por Fouchet et al. (2009) que mostrou que estirpes moderadamente virulentas relacionadas com o RHDV invadem e persistem nas populações de coelhos selvagens, com maior eficácia do que estirpes altamente virulentas ou não patogénicas.

Para além do RHDV2 induzir a mortalidade em coelhos com menos de 30 dias (Dalton et al., 2012), outras características diferenciadoras são indicadas como: taxa mortalidade de 20% em coelhos infetados experimentalmente sendo que os 70-80% animais restantes não apresentaram sinais típicos de DHV (Le Gall-Reculé et al., 2013), exibe um leque de hospedeiros mais ampla infetando várias espécies de lebres causando uma doença *DHV-like* (Puggioni et al., 2013; Camarda et al., 2014). A sequencia proteica da cápside do RHDV2 é apresenta uma similaridade de 80% com a do RHDV e um perfil antigénico distinto (Le Gall-Reculé et al., 2011).

2.2. Taxonomia viral

O vírus não é passível de cultivo *in vitro* o que levou a que os primeiros esforços de classificação do RHDV fossem infrutíferos (Abrantes et al., 2012b). O Comité Internacional de Taxonomia Viral [ICTV] reconhece quatro géneros na família *Caliciviridae*: Vesivirus, Norovirus, Sapovirus e *Lagovirus*. O RHDV, bem como o EBHSV (*European Brown Hare Syndrome Virus*) pertencem ao género *Lagovirus*. O EBHSV está intimamente relacionado com o RHDV no que respeita aos sinais clínicos, caracterização histopatológica, índice de mortalidade, morfologia do virião e antigenicidade, mas não existem evidências de infeção ou proteção interespecies (Abrantes et al., 2012b). Apesar destas semelhanças referidas, estes dois vírus são dois agentes distintos (Capucci et al., 1991; Marcato et al., 1991; Chasey, Lucas, Westcott & Williams, 1992; Wirblich et al., 1994; Lavazza, Scicluna & Capucci., 1996). O EBHSV foi reportado pela primeira vez em 1980 na Suécia (primeiramente que o primeiro surto de RHDV) afetando a lebre europeia (*Lepus europaeus*) e a lebre da Eurásia (*Lepus timidus*) (Lölinger & Eskens, 1991). O género *Lagovirus* inclui ainda o grupo de calicivírus não patogénicos (NP-RCV) já anteriormente referido, que leva a seroconversão assintomática (Capucci et al., 1996).

2.3. Características Moleculares do Virião

O virião (Figura 6) é de pequena dimensão (28-42 nm de diâmetro) e sem envelope (Valice, Smid, Rodak & Kudrna, 1990; Thouvenin et al., 1997; Lavazza, Tittarelli & Cerioli, 2015b). Uma grande percentagem das partículas virais apresenta um núcleo eletrão-denso com cerca de 23-25 nm de diâmetro, com uma orla onde se distribuem 10 projeções regularmente distribuídas, com 5-6 nm de comprimento (Capucci et al., 1991; Sibilía, Boniotti, Angoscini, Capucci & Rossi., 1995).

A cápside é composta por 90 capsómeros dímeros *arch-like* que formam 32 depressões em forma de copo (cáliz em latim, que atribui o nome à família) e apresenta morfologia icosaédrica

organizada em T=3 (Valicek et al., 1990; Capucci et al., 1991; Thouvenin et al., 1997; Bárcena et al., 2004).

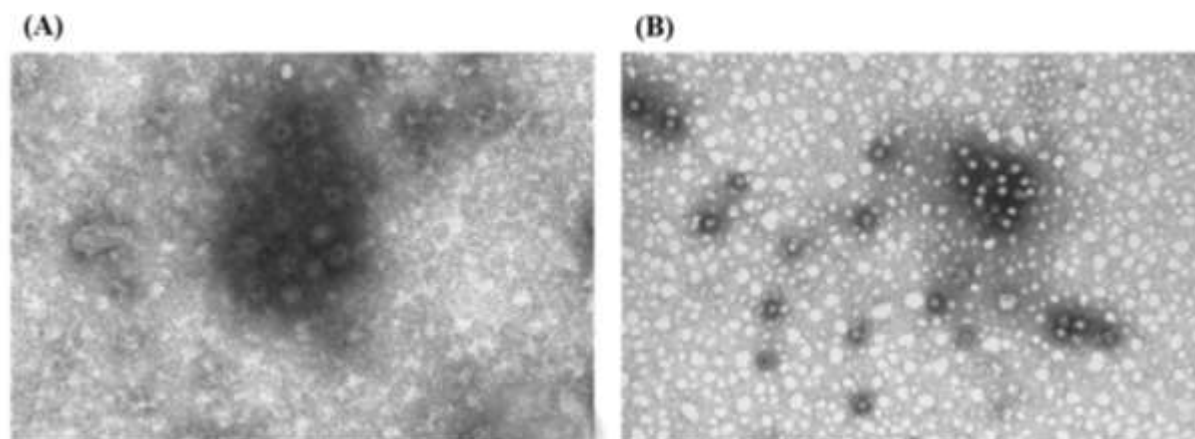


Figura 6 – Fotografia de microscopia eletrônica do RHDV. Foi realizado um homogenado centrifugado de fígado de coelhos infetados naturalmente com o vírus. Os viriões apresentam morfologia icosaédrica e estão rodeados por um halo eletrodense de anticorpos. (A) – microscopia eletrônica de imuno-agregação (IAEM) de um *pool* de soros diluído 1:40 de animais que sobreviveram após infecção experimental (B) Controlo negativo do IAEM, com partículas de RHDV distribuídas isoladas ou em pequenos grupos (Lavazza et al., 2015b).

Cada monómero da cápside é composto por um domínio *shell* (S) que está em profundidade e compreende o domínio N-terminal ligado por uma “dobradiça” (*hinge*) ao domínio P (*protruding*) que abrange a região C-terminal, e que está exposto na superfície do virião (Prasad, Rothnagel, Jian & Estes, 1994; Wirblich et al., 1994; Capucci et al., 1995; Lavazza et al., 1996; Thouvenin et al., 1997; Bárcena et al., 2004; Hu et al., 2010).

O domínio P pode ainda ser subdividido nos subdomínios P1 (haste do arco) e P2 (topo do arco) (Neill, 1992). Este último subdomínio, P2, localizado na zona mais exposta da cápside, apresenta a maior variação genética. Esta variação é estimulada, no mínimo em parte, pela pressão de seleção dos anticorpos do hospedeiro que reconhecem regiões deste subdomínio (Capucci et al., 1995; Martinez-Torrecuadrada et al., 1998; Bárcena et al., 2004). Esta variação ocorre de forma muito rápida, de forma a contrariar o reconhecimento pelos anticorpos, levando a aumento da variabilidade genética e variação antigénica (Esteves et al., 2008; Kinnear & Linde, 2010). Esta variabilidade é partilhada com todos os vírus de RNA e decorre de uma propriedade intrínseca relacionada com a elevada taxa de erro na incorporação de nucleótidos pela RNA polimerase dependente de RNA durante a replicação, levando ao aparecimento de vários vírus mutantes que ficam disponíveis para seleção e adaptação a novas circunstâncias (Steinhauer et al., 1992). As mutações no RHDV ocorrem em todo o genoma, incluindo nos genes da polimerase e da proteína da cápside (Lopes, 2016).

O domínio S é relativamente constante ao passo que o domínio P contém determinantes envolvidos nas interações de recetores entre o vírus e hospedeiro e participa na diversidade antigénica viral (Bárcena et al., 2004, 2015; Hu et al., 2010; Luque et al., 2012).

Os capsómeros possuem uma proeminência em forma de chapéu na região de P2, indicando uma estrutura antigénica específica, possuindo dois locais de ligação para anticorpos monoclonais (MAb) (Thouvenin et al., 1997; Hu et al., 2010). A variabilidade de aminoácidos no subdomínio P2, deve-se, pelo menos parcialmente, à pressão de seleção induzida pelos anticorpos do hospedeiro que se ligam nesta região (Martinez-Torrecuadrada et al., 1998; Bárcena et al., 2004).

2.4. Genoma Viral

Na Figura 7 encontra-se esquematizada a organização do genoma do RHDV. A helicase pode também receber a denominação de 2C-like ou p37 e a p58 a denominação de RdRp (RNA polimerase dependente de RNA). A ORF1 (*open reading frame 1*) codifica uma proteína que é processada na proteína maioritária da cápside viral, a VP60, e nas proteínas não estruturais P16, P23, P37 (helicase), P29, VPg, P15 (protease) e RdRp ou P58. Estruturalmente, a proteína VP60, pode ainda ser dividida em 6 regiões principais (A a F), das quais as regiões C e E, localizadas no subdomínio P2, apresentam a maior diversidade genética (Neill, 1992). O ORF2 codifica uma proteína estrutural minoritária que é dispensável para a produção de VLPs em células de inseto. O sgRNA contém também estas duas ORF, embora na ORF1 não esteja presente a sequência codificante das proteínas não estruturais (Abrantes et al., 2012a; Urakova et al., 2015). A junção *p58-vp60* é um local de recombinação frequente (Meyers et al., 1991), embora outros tenham sido recentemente identificados (Lopes et al., 2015).

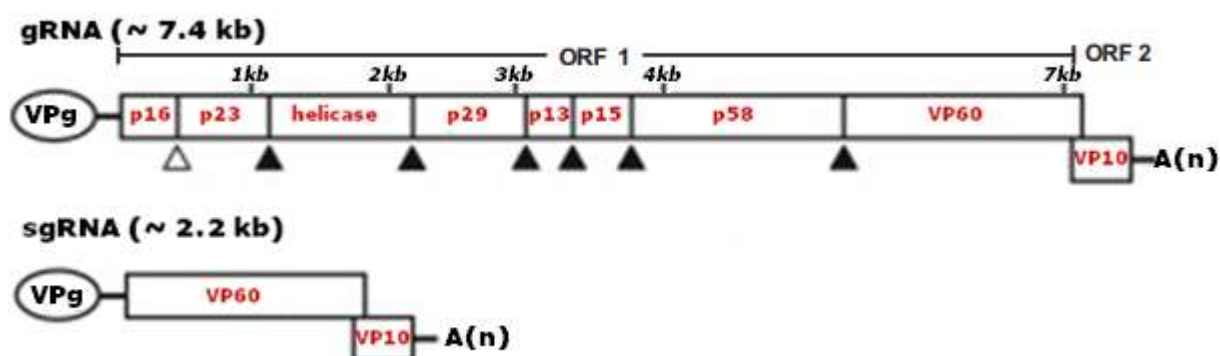


Figura 7 – Organização genómica do RHDV. Os triângulos pretos e brancos indicam locais de clivagem provados e suspeitos, respetivamente. Adaptado de Abrantes et al., (2012a) & Urakova et al., (2015)

O virião contém o RNA genómico (gRNA) com cerca de 7,4 kb (7437 nucleótidos) e um RNA subgenómico (sgRNA) com cerca de 2,2 kb colinear com a extremidade 3' do gRNA (Meyers et al., 1991, 2000; Wirblich, Thiel & Meyers, 1996). Este sgRNA tem um papel na síntese de produtos necessários nas fases intermédia e tardia da infeção (*e.g.* proteínas estruturais) (Miller & Koev, 2000). Estas proteínas estruturais, incluem no caso do RHDV, as proteínas da cápside e a VP10 (Neill, Reardon & Heinrikson, 1991; Bog, Marín, Casais, Prieto & Parra, 1992; Sibilía et al., 1995). O gRNA e sgRNA são poliadenilados nas suas extremidades 3' e são covalentemente ligados na extremidade 5', através de um resíduo Tyr-21, à proteína VPg (*virus genome-linked*) (Meyers et al., 1991; Machí, Martín Alonso & Parra, 2001). O RNA viral é de cadeia simples e polaridade positiva (Tham, Barnes & Hunter, 1999), sendo o genoma organizado em ORFs. A ORF1 compreende o nucleótido 10 ao 7044 e a ORF2 o nucleótido 7025 ao 7378 (Meyers et al., 1991). A VP60 é o principal alvo da resposta imunitária do hospedeiro contra o RHDV e desempenha um papel importante no diagnóstico viral e no desenvolvimento de vacinas (Esteves et al., 2008).

2.5. Filogenia viral

Análises filogenéticas baseadas na sequência nucleotídica do gene *vp60*, permitiram revelar que os lagovírus dos coelhos se distribuem por 4 grupos filogenéticos, cuja separação é fortemente suportada (Le Gall-Reculé et al., 2013):

- I. isolados patogénicos de RHDV (grupos genéticos G1 a G5) e RHDVa (grupo genético G6);
- II. MRCV, 06-11 e estirpe de Ashington;
- III. isolados patogénicos de RHDV2;
- IV. isolados RCV-A1 da Austrália.

A evolução do vírus parece seguir pois um padrão cronológico (Le Gall-Reculé et al., 2003) embora haja evidências de segregação geográfica (*e.g.* deteção de um único genogrupo (G5)) nos Açores devido ao isolamento insular, predominância do genogrupo G1 na Península ibérica tendo os Pirenéus funcionado como uma barreira física à movimentação das populações infetadas da Europa central). Todos os seis genótipos (G1 a G6) reconhecidos são altamente patogénicos e virulentos para o coelho-bravo (Kerr, Kitchen & Holmes, 2009). O G6 (RHDVa) é o subtipo antigénico que se tornou prevalente em certos países incluindo os EUA (McIntosh et al., 2007). Outros calicivírus entéricos não patogénicos (NP-RCV) relacionados com o RHDV, foram pontualmente identificados na Europa e Austrália (Capucci, Fusi, Lavazza, Pacciarini & Rossi, 1996; Strive, Wright & Robinson, 2009; Le Gall-Reculé et al., 2011).

Os isolados franceses de RHDV foram organizados em 5 grupos genéticos (G1 a G5) de acordo com uma distribuição temporal (Le Gall-Reculé et al., 2003). Posteriormente foi proposta uma organização em 3 grupos maiores, um dos quais inclui os grupos genéticos anteriores G3, G4 e G5 (Kerr et al., 2009; Kinnear & Linde, 2010). RHDVa forma um grupo genético distinto (G6 de acordo com Le Gall-Reculé et al. (2003), grupo 1 ou clade D de acordo com Kerr et al. (2009) e Kinnear & Linde (2010)) embora exista proteção cruzada quase completa entre os genogrupos G1 a G5 e o G6 (RHDVa).

De acordo com Le Gall-Reculé et al. (2013) a identidade média de nucleótidos entre o RHDV2 e o RHDVa (G6) era de 82,4% em 2013. O RHDV2 partilha 82% de identidade com o RCV, 06-11 e MRCV e 80,6% com os isolados de RCV-A1. A identidade de nucleótidos é de 70,4% com o EBHSV mostrando que o RHDV2 é próximo dos outros lagovírus do coelho. A semelhança de aminoácidos é de 89,2% com os genogrupos G1 a G5 e G6 (RHDVa), RCV, 06-11 e MRCV, 87,4% com o RCV-A1 e de 76,7% com o EBHSV. De acordo com Kinnear and Linde, (2010), as sequências dos genes das proteínas da cápside fornecem informação suficiente para permitir uma inferência filogenética robusta.

Le Pendu et al. (2017) propuseram uma nova nomenclatura em que reconhecem a existência de apenas uma espécie de lagovírus (*Lagovirus europaeus*). Esta por sua vez é dividida em dois genogrupos: *RHDV-related viruses* e *EBHSV-related viruses*. Cada um dos genogrupos pode ser subdividido em genótipos, que por sua vez, podem ser subdivididos filogeneticamente em variantes desde que bem suportadas por valores de *bootstrap*. Nesta proposta o RHDV2 é designado GI.2.

2.6. Ciclo viral

Após a ligação do vírus aos recetores celulares, ocorre internalização do vírus. O genoma viral é libertado e ocorre tradução no precursor da poliproteína e um processo de co-tradução das proteínas não estruturais. Estas últimas, formam um complexo de replicação que sintetiza o RNA genómico (gRNA). Este é traduzido em precursor de poliproteína ou é incluído no processo de montagem de viriões. O RNA anti-genómico (anti-gRNA) é utilizado como molde para a produção de gRNA e anti-gRNA. O anti-gRNA é também utilizado para a produção de RNA subgenómico que é traduzido em proteínas estruturais, VP60 e VP10. A VP60, é nos lagovírus, também originária do precursor da poliproteína após processamento pela protease viral. Original, Humphre, Dalke & Schulten.(1996), Abrantes et al .(2012b) & Carvalho (2017). Na Figura 8 encontra-se uma representação esquemática e simplificada do ciclo de replicação do RHDV nos hepatócitos.

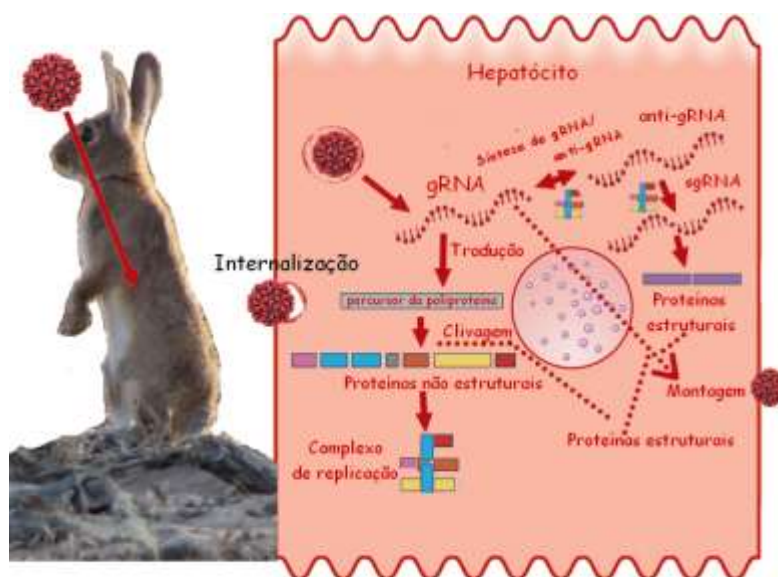


Figura 8 – Esquema do ciclo viral. As diferentes estruturas encontram-se muito simplificadas e não se encontram à escala (*Original do autor*).

2.7. Fisiopatologia

O RHDV afeta apenas coelhos do género *Oryctolagus* que, por exemplo, nos Estados Unidos é limitado às populações domésticas. Espécies de coelhos selvagens naturais dos Estados Unidos não foram suscetíveis à infeção experimental pelo RHDV (United States Animal Health Association, 2008).

O coelho oriental (*Sylvilagus floridanus*) é um lagomorfo pertencente à família *Leporidae*, à qual pertence também o género *Lepus* e o género *Oryctolagus*, suscetível ao EBHSV (Lavazza et al., 2015a) mas não suscetível ao RHDV. Contudo, refere-se que, dada a capacidade recentemente identificada do RHDV2 infetar outras espécies para além do *Oryctolagus cuniculus*, a possibilidade de o coelho oriental poder também vir a ser infetado por este vírus, devendo ser implementada monitorização.

A via fecal-oral é a principal via de transmissão RHDV (Leuthol, Dalton & Hansman., 2015) e a replicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Xu & Chen, 1989). O coelho mostrou expressar antígenos de grupo sanguíneo na superfície do duodeno e também na traqueia e dutos biliares (Nyström et al., 2011). Foi demonstrada a ligação dos genogrupos G1 a G5 e G6 (RHDVa), a antígenos de grupo sanguíneo, dependendo da estirpe e com magnitude variável (Nyström et al., 2011). Os antígenos de grupo sanguíneo parecem desempenhar um papel

relevante na infeção actuando como fatores de ligação (ligandos), mas não constituindo o principal recetor celular (Nyström et al., 2011).

Se uma população selvagem se encontra parcialmente protegida por imunidade cruzada, adquirida através da infeção previa com calicivirus não patogénicos (NP-RCV), pode haver redução da pressão de seleção para coelhos geneticamente resistentes com fenótipos de ligando mais fraco para antígenos de grupo sanguíneo (Nyström et al., 2011).

O primeiro local de replicação do RHDV são as criptas de Lieberkühn, no intestino (Gregg et al., 1991), passando depois para o fígado (Marcato et al., 1991), sendo o hepatócito considerado o principal alvo de replicação viral, não obstante não expresse antígenos de grupo sanguíneo (Ruvoën-Clouet et al., 2000; Nyström et al., 2011). É por isso expectável que existam, nesta célula, outros recetores celulares para o vírus (Abrantes et al., 2012b).

A DHV, quando surgiu (tendo como agente etiológico o RHDV), levou à mortalidade de 70-100% dos animais adultos infetados (Capucci et al., 2017), embora nos juvenis não se registasse doença, ou esta se desenvolvesse numa forma subclínica (Mikami, Park, Kimura, Ochiai & Itakura, 1999). Esta distinção na suscetibilidade dependente da idade é ainda pouco compreendida, mas pode dever-se a utilização, por parte do vírus, de recetores teciduais específicos que apenas surgem no estado adulto (Ruvoën-Clouet, Ganiere, Andre-Fontaine, Blanchard & Le Pendu, 2000; Marques et al., 2012). Ruvoën-Clouet et al. (2000) demonstraram que o vírus se liga a antígenos de grupo sanguíneo, expressos na mucosa do aparelho respiratório superior e trato digestivo de animais adultos, sendo que a densidade destes recetores nas células da mucosa determina a suscetibilidade/resistência ao RHDV. Nos juvenis, há uma menor expressão destes recetores havendo por isso uma ligação fraca do vírus. Contudo, esta fraca ligação parece apenas proteger parcialmente os animais da doença (Nyström et al., 2011; Abrantes et al., 2012b) o que sugere a existência de mecanismos adicionais na base da menor suscetibilidade dos juvenis.

Coelhos com menos de 3 semanas de idade não desenvolvem a doença quando infetados experimentalmente pelo RHDV mas a sua suscetibilidade revela-se crescente a partir das 4 semanas atingindo um pico às 9 semanas (Morisse et al., 1991). A resposta imunitária dos juvenis difere da resposta dos adultos pelo que a evidência de infeção requer uma interpretação serológica mais criteriosa (Cooke, Robinson, Merchant, Nardin & Capucci et al., 2000). A ausência de infeção por RHDV em coelhos muito jovens pode resultar da ausência de hepatócitos ou outras células em quantidade e estadio de desenvolvimento celular suficiente para suportar a replicação viral (Cooke et al., 2000).

A concentração do vírus é máxima no fígado seguindo-se o pulmão, rim e baço (Pu, Xu & Zhou., 1984; Chen, 1986). Todas as tentativas de infeção de outras espécies (porco, hamster,

ratos, ratinho ou embrião de galinha) a partir de suspensões de tecidos de coelhos infectados fracassaram (Wang, Sun & Zhou., 1986a).

Foi sugerido por Xu, Shen & Liu (1985) que a virémia é responsável pelas lesões, sendo a morte súbita a consequência da disfunção multiorgânica resultante de congestão e edema pulmonar extensivos, pneumonia sero-hemorrágica severa, hemorragias focais e necrose do cortex adrenal, alterações circulatórias generalizadas dos rins e necrose hepática. A coagulação intravascular disseminada (DIC) parece ser importante no desenvolvimento da doença (Sheng, Wang & Xu, 1985; Chen, 1986; Xu, Wang & Wang, 1986) pela presença de numerosos trombos fibrinosos nos capilares dos rins, pulmão, fígado, cérebro entre outros órgãos (Sheng et al., 1985; Chen, 1986; She, Chen & Gao, 1986; Xu et al., 1986). Vacuolização do citoplasma, edema e degenerescência das mitocôndrias e ruptura da membrana plasmática das células parenquimatosas do fígado e pulmões bem como das células endoteliais associadas, são alterações ultraestruturais comuns (She et al., 1986; Wei et al., 1987).

Foi demonstrado experimentalmente por Le Gall-Reculé et al. (2013) que o RHDV2 é menos virulento que o RHDV, tendo em conta que a mortalidade ocorre mais tardiamente e durante um período maior. A doença desenvolvida também difere da induzida pelo RHDV na apresentação clínica, tendo em conta que as formas crônica e sub-aguda são mais frequentes na doença por RHDV2. As lesões histopatológicas e macroscópicas induzidas pelos dois vírus são semelhantes (Le Gall-Reculé et al., 2013; Lopes et al., 2014a). Contudo, a frequência de degenerescência hepática severa, esplenomegália e icterícia é maior na doença induzida pelo RHDV2, reflexo da maior frequência de quadros de doença subaguda/crônica (Le Gall-Reculé et al., 2013). A suscetibilidade de coelhos com 11 dias de idade ao RHDV2 já foi reportada (Le Gall-Reculé et al., 2011; Abrantes et al., 2013; Le Gall-Reculé et al., 2013), sendo que os coelhos jovens apresentam lesões macro e microscópicas semelhantes às encontradas nos animais adultos (Dalton et al., 2012). A taxa de mortalidade relatada por Dalton et al. (2012) para o RHDV2, em adultos e juvenis, foi respetivamente de 20 e 50% para o intervalo de tempo e local geográfico dos casos estudados.

O vírus aglutina eritrócitos de ovelha, galinha e todos os tipos de sangue do homem, sendo que a aglutinação mais forte ocorre com o tipo O sanguíneo (Liu et al., 1984; Wang, Tian, Qian, Chen & Yu, 1986b) mas não aglutina eritrócitos de cavalo, mula, burro, vaca, pato, ganso, codorniz, cão, porco, coelho, cobaias, murganhos, ratos e outros roedores (Liu et al., 1984; Xu, Wang & Wang, 1985; Chen, 1986; Wang et al., 1986a, 1986b). O teste de inibição da hemaglutinação pode ser usado para a detecção de anticorpos anti-RHDV no soro (Pu et al., 1985). O título de aglutinação foi significativamente reduzido com congelações e descongelações sucessivas (Liu et al., 1984) ou tratamento com 0,25% de pancreatina (Wang

et al., 1986b) mas não ocorreram alterações significativas após tratamento com clorofórmio, pH 3,0 a 8,0, aquecimento a 50°C durante 60min ou a 56°C durante 15min (Pu et al., 1984; Wang et al., 1986b). O vírus é inativado com 1% de hidróxido de sódio (Chen, 1986) ou por 0,4% de formaldeído. Este último não reduz a imunogenicidade do vírus (Xu et al., 1985).

Duas proteínas envolvidas na replicação do RNA viral, nomeadamente uma helicase, a RdRp, e uma proteína responsável pelo processo proteolítico da poliproteína maior foram já caracterizadas (Boniotti et al., 1994; Vazquez, Martin Alonso, Casais, Boga & Parra, 1998; Marin, Casais, Martin Alonso & Parra., 2000). À RdRp foi também atribuído o papel de catalisador da uridilação da VPg (Machín, Martín Alonso & Parra., 2001; Machín, Martin Alonso, Dalton & Parra 2009). Goodfellow et al. (2005) sugeriu um papel para a VPg na tradução. A função das proteínas não estruturais p16, p23 e p29 ainda permanece desconhecida. A proteína estrutural minoritária, (VP10) demonstrou ter um papel de estimulação da replicação viral e promoção da apoptose (Liu et al., 2008), bem como uma ação de *downregulation* da expressão da VP60 (Chen et al., 2009). Estas considerações parecem sugerir que a VP10 possa ter um papel na regulação da replicação viral e na libertação dos viriões das células hospedeiras (Chen et al., 2009).

2.8. Sinais clínicos e lesões anatomo-histopatológicas

O período de incubação da doença varia entre 1 e 3 dias e os animais sucumbem geralmente 12h a 36h após a instalação de febre (temperatura superior a 40°C) (Xu & Chen, 1989; Marcato et al., 1991) em surtos de RHDV. No caso do RHDV2, 3 isolados diferentes levaram a 80% de doença aguda, induzindo a morte em 70 h a 85 h pós- infecção (Capucci et al., 2017). A morte por DHV ocorre em média 2-3 min após o início dos sinais neurológicos (Henning, Meers, Davies & Morris, 2005).

A DHV pode assumir clinicamente três formas:

1. Forma hiperaguda – normalmente ocorre no primeiro surto da doença em determinado local (Xu et al., 1985). A morte súbita é habitual e normalmente não há observação de sinais clínicos (Liu et al., 1984; Xu et al., 1985). Pode ocorrer descarga sanguinolenta espumosa das narinas ou hemorragia vaginal (Xu et al., 1985).

2. Forma aguda – predomina em áreas onde a doença se tornou epidémica (Xu et al., 1985). Os animais infetados geralmente mostram depressão, relutância ao movimento e anorexia.

Temperatura corporal igual ou superior a 41°C nos estádios iniciais após os quais fica normal (Xu & Chen, 1988). Geralmente ocorre taquipneia e cianose das mucosas e pele. Alguns animais apresentam distensão abdominal, constipação ou diarreia e hematúria (Chen, 1986). Podem assumir um decúbito lateral e movimentos descontrolados dos membros. Alguns animais morrem durante as convulsões. Outros ficam frenéticos nas gaiolas e emitem um “guincho” antes de morrerem (Chen, 1986). Cerca de 20% dos animais apresentam descarga sanguinolenta espumosa das narinas (Xu et al., 1985). O curso da doença decorre em 12 a 36h (Chen, 1986).

3. Forma subaguda - normalmente ocorre após um curso epidémico (Xu et al., 1985; Xu & Chen, 1988). Exibem depressão, anorexia e febre, assemelhando-se à forma aguda. Estes sinais clínicos geralmente duram 2 a 3 dias e a maioria dos animais sobrevive ficando resistentes à reinfeção (Xu & Chen, 1988). O exame hematológico geralmente revela uma leucopénia severa (Chen, 1986). A leucopénia é devida a uma diminuição no número de linfócitos, que descem dos cerca de 73% nos animais saudáveis, para 34% nos animais doentes. Contudo, já foram reportadas leucocitoses em animais infetados (Chen, Zeng, Ning & Yin., 1987) indicando que outros fatores podem afetar este parâmetro hematológico.

A infeção pelo RHDV em coelhos com 4 a 5 semanas de idade foi monitorizada por RT-PCR por Shien, Shieh & Lee (2000) tendo sido detetado RNA viral no baço e bilis, até 42 dias após inoculação. Estes autores verificaram ainda que o tratamento com dexametasona ou com vacina para LPC ao dia 42, não permitiram a reativação da replicação viral.

Na Tabela 2 encontram-se descritas as principais lesões macro e microscópicas, reportadas por diversos autores e compiladas por Henning (2003) em animais afetados por DHV. É frequente que os quadros lesionais anatomo-histopatológicos não sejam completos, embora o fígado seja referido como lesado em todas as descrições, o que se deve ao facto de ser o principal órgão alvo da infeção viral.

Tabela 2 - Principais lesões anatomo-histopatológicas encontradas na doença hemorrágica viral do coelho.

Lesões		
	Macroscópicas	Microscópicas
Fígado	Diminuição da consistência, hepatomegália, descoloração amarelo pálido ou vermelho escuro. Padrão lobular marcado. Superfície finamente granular.	Necrose multifocal, principalmente na periferia dos lóbulos. Hepatócitos com eosinofilia homogênea. Calcificação distrófica e fibrose. Infiltração portal e sinusoidal por células mononucleadas. Anisomorfismo hepatocitário, presença de pigmento biliar ou hemossiderina. Esteatose microvacuolar. Sinais de cirrose hepática na forma sub-aguda.
Traqueia	Hiperémia, presença de fluído sanguinolento.	Hiperémia da mucosa. Infiltração leucocitária. Calcificação da mucosa.
Pulmão	Congestão e edema. Hemorragias extensas e/ou petequiais.	Hemorragias intra-alveolares. Microtromboses nas capilares alveolares. Edema alveolar.
Rim	Pálido, renomegália, descoloração vermelha heterogênea.	Hiperémia, hemorragias medulares. Microtrombos hialinos nos capilares glomerulares. Necrose do epitélio tubular.
Baço	Esplenomegália. Descoloração vermelho escuro.	Necrose hialina da polpa vermelha. Linfopénia e cariorrexia folicular. Microtrombos hialinos nas arteríolas centrais.
Trato digestivo	Gastrite catarral com erosões da mucosa. Obstipação cecal e estomacal. Hemorragias subserosas.	Necrose das criptas do intestino delgado e atrofia das vilosidades.
Miocárdio	Hemorragias do miocárdio.	Hemorragias subepicárdicas ou miocárdicas e degenerescência dos cardiomiócitos.
Timo	Hemorragias.	Necrose linfocítica

Adaptado de Henning (2003).

2.9. Métodos de Diagnóstico

O vírus não é cultivável em células pelo que o diagnóstico se estabelece pela deteção de i) genoma viral, por exemplo RT-qPCR (Duarte *et al.*, 2015), ii) proteína viral, por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e por imunohistoquímica (Carrasco *et al.*, 1991), iii) viriões, por microscopia eletrónica (Lavazza *et al.*, 2015b)), iv) anticorpos anti-RHDV, por *Western Blotting* (Capucci *et al.*, 1995), por ELISA (Ohlinger, Haas, Meyers, Weiland & Thiel,

1990) e por hemaglutinação, o primeiro teste utilizado de diagnóstico serológico (Pu et al., 1985) e, em último caso, v) pela infecção experimental de coelhos (Dalton et al., 2012).

2.10. Preparação de amostras

O diagnóstico anatomo-histopatológico deve incidir sobre o fígado, baço, pulmão, rim entre outros órgãos (OIE, 2015a). De acordo com a informação disponível na literatura, o órgão de eleição para o diagnóstico molecular é o fígado, onde se verifica o título viral mais elevado (10^3 DL₅₀ a $10^{6.5}$ DL₅₀/ ml de homogeneizado a 10%). A quantidade de vírus presente nos diferentes órgãos parece ser proporcional à sua vascularização. Nos casos de doença crónica ou subaguda, o soro sanguíneo e o baço podem conter o maior título viral, sendo preferíveis para o diagnóstico destes casos (OIE, 2015b). Liu et al. (2015) avaliou a distribuição do vírus nos diferentes órgãos. Neste estudo, a matriz que apresentou a maior concentração de RNA viral foi o baço, seguido do fígado e rim. O coração, pulmão, traqueia, soro sanguíneo e urina apresentaram valores de concentração de RNA viral intermédios, sendo o intestino delgado a matriz que apresentou menor concentração.

O fragmento de órgão recolhido para diagnóstico deve ser homogeneizado com PBS tamponado a pH 7,2, para uma concentração final (p/v) de 5-20% e clarificado por centrifugação 3-8000 rpm durante 5-15 min (Capucci et al., 1991). O sobrenadante pode ser utilizado para o diagnóstico por hemaglutinação ou ELISA, ou para extração de ácidos nucleicos. Para a visualização por microscopia eletrónica, procede-se a uma segunda centrifugação a 10.000-12.000 rpm durante 5-15 min antes da ultracentrifugação final (Capucci et al., 1991). Para PCR ou RT-PCR, o RNA viral é utilizado diretamente após extração dos tecidos (OIE, 2015b). Para melhor preservação do RNA, todos os passos devem ser realizados a 4°C (Capucci et al., 1991).

2.11. Interpretação dos resultados dos métodos moleculares

A utilização de diversas vacinas para a DHV e Mixomatose, associados a repovoamentos descontrolados e a ausência de identificação dos animais selvagens, deve ser tomada em conta na interpretação dos resultados de RT-qPCR pois podem afetá-los.

O método molecular utilizado para deteção de RNA de RHDV2, foi desenvolvido no INIAV (Duarte et al, 2015) consistindo num RT-PCR quantitativo *Taqman*, recomendado atualmente pelo manual da OIE. O valor de Cq (*Cycle quantification*) é inversamente proporcional à carga viral de acordo com a equação $y=mx+b$, sendo y a carga viral, x o valor de Cq, m o declive da reta (- 3.336) e b a ordenada na origem (43.386) (Duarte et al., 2015).

Em animais não vacinados e desenvolvendo doença aguda, são obtidos valores de Cq baixos (correspondendo a cargas virais altas), sendo a interpretação do diagnóstico molecular fácil e direta (Duarte et al., 2015; Carvalho et al., 2017). Naturalmente, apesar do diagnóstico molecular ser o diagnóstico definitivo, a sua concordância com a observação de lesões histopatológicas é de extrema importância. No entanto, devido às taxas de mortalidade variáveis descritas para o RHDV2 (Le Gall-Reculé et al., 2011, 2013; Dalton et al., 2012) devem ser tidos em conta outros diagnósticos diferenciais, uma vez que a positividade para o vírus pode não estar relacionada com a mortalidade.

O RNA genómico ou fragmentos de RNA do RHDV podem persistir em coelhos adultos que superam a infeção pelo vírus. Tendo em conta que o método de RT-qPCR deteta qualquer cadeia de RHDV2, uma vez que a região alvo é altamente conservada, a sequenciação do gene Vp60 é necessária para diferenciar as estirpes vacinais de selvagens.

A alta sensibilidade do método molecular leva a que o RNA viral da vacina inativada possa originar sinais positivos fracos no RT-qPCR, se ainda estiver presente nos tecidos. Diversas hipóteses podem explicar a presença do RNA vacinal nos tecidos, mesmo utilizando vacinas inativadas, nomeadamente a injeção intravenosa não intencional, o aumento de permeabilidade sanguínea no local da injeção ou a associação do vírus inativado a eritrócitos (Eschbaumer et al., 2010; Steinrigl, Revilla-Fernández, Eichinger, Koefer & Winter, 2010; De Leeuw et al., 2015).

No caso do RHDV2, a quantidade de RNA vacinal nos diferentes tecidos após vacinação, nunca foi investigada. Contudo, no que diz respeito ao RHDV, Gall & Schirrmeier (2006) observaram, através de um multiplex RT-qPCR 100% específico, que o RNA vacinal não foi detetado 9 semanas após vacinação, provavelmente devido ao título baixo de vírus contido em cada dose, em contraste com o RNA viral decorrente de uma infeção experimental, que foi detetado até 15 semanas após inoculação (Gall & Schirrmeier, 2006).

Carvalho *et al.* (2017) não detetaram vírus vacinal inativado mesmo nos primeiros 15 dias após vacinação. De facto, a análise sequencial descartou por completo que o vírus vacinal estivesse a interferir no resultado de PCR. Carvalho et al. (2017) mostraram também que a carga viral em animais vacinados é muito inferior (valor médio de Cq de $32,01 \pm 6,18$) à dos animais não vacinados domésticos (valor médio de Cq $15,23 \pm 3,82$) e selvagens (valor médio de Cq $14,33 \pm 3,97$).

Nos coelhos domésticos adultos vacinados, foi encontrada uma carga viral média de 4.29×10^2 partículas por mg de fígado, cerca de 80.000 vezes inferior ao estimado previamente em coelhos selvagens infetados por RHDV2 com o mesmo método (1.5×10^8 cópias/mg) (Duarte et al., 2015). Esta diminuição na carga viral no fígado em animais vacinados que sofreram infeção,

pode refletir o efeito da vacinação na progressão da doença e comprova a sua utilidade dos pontos de vista clínico e epidemiológico (Carvalho et al., 2017).

2.12. Transmissão e disseminação

A perpetuação e disseminação dos agentes patogénicos na população hospedeira é influenciada por um conjunto de processos epidemiológicos e fatores de interação hospedeiro-demografia. A disponibilidade de animais jovens e a mortalidade condicionam a disponibilidade de população suscetível à infeção (Wells et al., 2015). Consequentemente, alterações na demografia ou epidemiologia espaço-temporal podem influenciar fortemente a dinâmica entre o hospedeiro e o agente patogénico (Lloyd-Smith et al., 2005; Fouchet, Marchandeu, Bahi-Jaber & Pontier, 2007; Peel et al., 2014).

Com base nas lesões hepáticas causadas pelo vírus, Morisse et al. (1991) hipotetizaram que a via fecal-oral seria a principal forma de transmissão. Xu et al. (1985) e Lenghaus, Westbury, Collins, Ratnamohan & Morrissy (1994) demonstraram a fácil transmissão da doença entre coelhos mantidos em viveiros artificiais, sem insetos, sugerindo a hipótese de que o contato próximo entre animais seria suficiente para a transmissão. Também as secreções e excreções de animais infetados, pelo, alimento contaminado, água, tesouras, utensílios, veículos e pessoas foram descritos como importantes na transmissão da doença (Xu et al., 1985). A via eólica foi sugerida como meio de disseminação a grande distância das partículas virais (Chen, 1986). Estudos experimentais demonstraram também que a via principal de infeção é oral seguida da conjuntival, nasal e traumatismo cutâneo (Xie et al., 1986). A morbidade induzida por estas diferentes vias é semelhante em condições experimentais, sendo a mortalidade superior quando a via de infeção é oral (Xie, Cheng, Wei, Chen & Yin, 1986).

A transmissão indireta por insetos é uma via de transmissão por veículo animado (ou vetor). A investigação laboratorial de Gehrmann & Kretzschmar (1991) demonstrou que as moscas (*Phormia spp.*) podem transmitir o RHDV2 e Lenghaus et al. (1994) comprovaram a transmissão experimental por *Culex annulirostris*, *Spilopsyllus cuniculi* e *Xenopsylla cunicularis*. O papel das moscas foi também demonstrado em estudos laboratoriais de ingestão, sobrevivência e excreção do vírus ingerido por estes artropodes (Wardhaugh & Rochester, n.d.; Asgari, Hardy & Cooke, 1999). De facto, tanto as fezes, como o regurgitado das moscas, podem conter partículas virais capazes de infetar coelhos, direta, ou indiretamente através do contacto com a vegetação. Estas partículas virais mantiveram-se infecciosas até 9 dias em moscas (Schwensow et al., 2014).

Sob condições laboratoriais, já foi demonstrada a transmissão por *Musca vetustissima* (Asgari, Hardy, Sinclair & Cooke, 1998) de RHDV a coelhos suscetíveis.

O modo de transmissão dos vírus pelos insetos pode ser mecânico ou biológico (Chamberlain and Sudia, 1961). As moscas podem, teoricamente, transmitir o RHDV por transportarem o vírus de coelhos mortos para a conjuntiva de coelhos vivos como foi descrito por Gehrmann & Kretzschmar (1991), mas no caso da família *Calliphoridae*, isto torna-se menos provável porque existem habitualmente perto de animais em decomposição mas raramente perto de coelhos vivos, pelo que neste caso, a transmissão indireta seria mais provável (Asgari et al., 1998).

A ausência de vírus em moscas originadas de larvas removidas de cadáveres de coelhos infetados com DHV, e o declínio do RNA viral ao longo do tempo em moscas contaminadas sugere que o vírus não infeta, nem replica nos tecidos internos das moscas, permanecendo apenas no canal alimentar e no forro cuticular, que é perdido durante a muda. As partículas de vírus provavelmente são destruídas durante a metamorfose, pelas alterações que ocorrem no intestino (Greenberg, 1973). Asgari et al. (1998) demonstraram que as excreções orais ou fecais de moscas podem conter vírus viável e por isso, constituir uma fonte de infeção para os coelhos. Os coelhos são relativamente sedentários e territoriais pelo que a transmissão direta entre coelhos de diferentes colónias não explica, de forma sustentada, a velocidade de disseminação do vírus na natureza (Asgari et al., 1998). A dispersão por predadores como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) também parece improvável para explicar a taxa de disseminação, mesmo que o vírus possa permanecer viável ao longo do trato digestivo destes animais quando ingerem cadáveres infetados (Simón et al., 1994).

Diversos trabalhos na Ilha de Wardang, no sul da Austrália (Gehrmann and Kretzschmar, 1991; Lenghaus et al., 1994; Leighton et al., 1995; Frölich et al., 1998) sugeriram existirem diversos mecanismos possíveis para a propagação do vírus incluindo: (1) coelho para coelho por contacto direto ou contacto com carcaça infetada; (2) transmissão indireta por moscas contaminadas, pulgas, mosquitos, carraças ou (3) vetores mamíferos ou aves.

Foi relatado que o genoma completo do RHDV pode ser recuperado de coelhos que sobreviveram à DHV, sugerindo que o material genómico do vírus pode persistir durante a vida dos coelhos e ser excretado, com frequência variável, iniciando novos surtos (Forrester et al., 2003). Contudo, foram realizadas várias tentativas para provar esta hipótese, inclusive com utilização de fármacos imunossupressores para estimular a excreção, mas todos fracassaram (Shien et al., 2000; Forrester et al., 2003; Gall & Schirmer, 2006; Gall et al., 2007).

Kovaliski et al. (2014) estudaram a reativação do vírus persistente, tornando esta hipótese ainda mais remota. Mostram que amostras de vírus colhidas de carcaças de coelhos na Austrália nesse

ano não foram os antecedentes do vírus que viria a ser isolado no ano seguinte. Assim, o vírus que se propagou no ano seguinte, provavelmente não teria persistido em coelhos individuais, mas, em vez disso, parece ter sido introduzido de novo em cada ano. O vírus parece ser mantido ativo durante o ano, provavelmente num hospedeiro reservatório ainda não identificado, e voltar a propagar-se às populações de coelhos quando em resultado da época reprodutiva existem animais juvenis suscetíveis de originar um novo surto epizootico (Schwensow et al., 2014).

Embora a transmissão do RHDV seja possível entre populações de coelhos por contacto direto, a sua transmissão entre locais distantes é pouco provável desta forma (Abade dos Santos et al., 2017). Schwensow et al. (2014) demonstrou que o vírus foi transportado por insetos ou aves mais de 20 a 100 km sobre o mar. O vírus pode permanecer viável durante meses em tecidos animais dentro de uma toca fresca (McColl et al., 2002; Henning et al., 2005), e no cadáver do coelho permanece infetante no mínimo durante 3 meses. O vírus excretado para o ambiente por coelhos infetados permanece infeccioso até 1,5 meses (Henning et al., 2005). As fezes de animais que sobreviveram à doença, podem ser infetantes até 4 semanas após a infeção (Ohlinger et al., 1990; Gregg et al., 1991). Šmíd et al. (1991) demonstraram a resistência do RHDV, que permaneceu infeccioso depois de submetido 2 dias a 60°C e até 225 dias a 4°C. McColl et al. (2002) mantiveram carcaças de coelhos infetados a 2°C e colheram amostras de fígado até 30 dias após a morte. Apenas as amostras retiradas até o dia 20 foram capazes de infetar e levar à morte coelhos suscetíveis, tendo, depois disso, apenas existido seroconversão em alguns animais.

Os surtos epidémicos de DHV usualmente têm início em novembro e vão diminuindo até março do ano seguinte (Xu et al., 1985). A incidência diminuta no verão e outono foi explicada pela influencia da temperatura ambiental mais elevada na sobrevivência do vírus no ambiente (Liu et al., 1984; Xu et al., 1985; Xu et al., 1985). O surto epidémico geralmente dura 7-13 dias, atingindo o pico em 2 a 3 dias (Xu et al., 1985).

Asgari et al. (1998) sugeriram que as moscas dos géneros *Calliphora* e *Chrysomya*, pela sua biologia e hábitos alimentares, seriam potenciais vetores do RHDV. As características que as tornariam vetores prováveis incluem: alimentarem-se de animais vivos ou mortos (Greenberg, 1973), possuírem armaduras bocais capazes de penetrar 3-4 camadas de células da pele (Kovacs et al., 1986), regurgitarem durante ou depois de morderem (Medveczky et al., 1988), terem potencial para transmitir o vírus direta ou indiretamente através de superfícies contaminadas (Asgari et al., 1998). As moscas são capazes de se movimentar 7-15 km por dia (Greenberg, 1973), podendo explicar a disseminação do vírus a longas distâncias e para territórios insulares, como foi reportado recentemente no arquipélago das Berlengas (Abade dos Santos et al., 2017). O facto dos insetos (moscas e mosquitos) serem portadores de RNA viral, demonstrado por

positividade no RT-PCR, não significa que sejam capazes de transmitir o vírus a coelhos suscetíveis, como foi evidenciado por McColl et al. (2002).

Asgari et al., (1998) demonstraram que o vírus permanece mais de 7h nas patas das moscas. De acordo com McColl et al. (2002) o RT-PCR é mais sensível para a detecção do RHDV do que a prova biológica. Gehrmann & Kretzschmar (1991) descreveram que são necessárias 10-100 partículas virais para induzir a doença nos coelhos. Guittre et al. (1995) e Gould et al. (1997) reportaram que o RT-PCR é capaz de detetar 12 e 5-10 cópias genómicas por 100mg de tecido, respetivamente, isto é, menos do que a quantidade mínima capaz de produzir doença por inoculação em coelhos.

O vírus e a doença pode ser transmitido da carcaça de um animal infetado para um animal suscetível pelo menos até 95h após a morte do animal (McColl et al., 2002). Coelhos suscetíveis podem morrer após exposição a moscas que tenham tido contacto com carcaças infetadas intactas ou expostas. Assim é evidente o papel das carcaças infetadas na transmissão da doença em ambiente natural, independentemente de estar intacta ou de as vísceras já terem sido expostas por um necrófago (McColl et al., 2002). O vírus pode persistir infeccioso no fígado de carcaças até 3 semanas a 22°C (McColl et al., 2002), sendo possível que estas permaneçam como fonte de infeção, via vetores ou diretamente, no mínimo durante o mesmo período no ambiente. Apenas 1 em 13 das amostras dos insetos positivas ao PCR, continham vírus suficiente para causar a doença quando inoculado em coelhos suscetíveis (McColl et al., 2002). Os autores consideraram que, na maioria das amostras, o vírus havia sofrido degradação intestinal durante o período em que os insetos contaminados permaneceram nas armadilhas antes da análise. Uma observação que suporta esta hipótese é a morte de um único coelho após a inoculação, tendo este sobrevivido durante 5 dias, manifestamente mais do que o tempo habitualmente descrito de 36-48h (Lenghaus et al., 1994).

Já foi relatada a produção de anticorpos após a inoculação ou administração oral de RHDV numa longa lista de vertebrados (Leighton et al., 1995; Buddle et al., 1997). Em duas espécies de roedores (*Mus spretus* e *Apodemus sylvaticus*), que partilham o habitat com os coelhos selvagens, também já foi detetado RNA de RHDV (Merchán et al., 2011).

Tem sido sugerido que para além do papel como reservatórios, os roedores são provavelmente vetores mecânicos (Schirrmeier et al., 1990), apesar de não existirem estudos experimentais que o comprovem. No estudo recente de Rocha, Alda, Pagés & Merchán (2017) nenhum dos roedores mostrou alterações clínicas ou lesões anatomo-histopatológicas após a fase de contacto com coelhos inoculados, tendo sido detetado RNA viral nas fezes e/ou fígado. A presença do RNA de RHDV no fígado dos roedores sugere replicação viral ativa, apesar de não terem sido detetadas lesões consistentes com DHV, observadas nos coelhos. O *M. spretus* (e possivelmente

o *A. sylvaticus*) foi capaz de manter o RNA viral durante pelo menos 64 dias. A ingestão de fezes de coelhos pelos roedores (Valverde, 1967), combinada com a sua natureza ubíqua, utilizando muitas vezes as tocas dos coelhos como abrigo (Delibes-Mateos et al., 2008) tornam provável o papel catalisador desta espécie na transmissão e epidemiologia da doença.

2.13. Impactos social, económico e ambiental

A doença leva a elevadas perdas de carne e produtos técnicos (peles e pelo) e tem um impacto negativo devastador nas populações selvagens de coelho-bravo e consequentemente nas espécies que dependem direta ou indiretamente deste leporídeo (Gregg et al., 1991; Xu, 1991; Mitro & Krauss, 1993; Delibes-Mateos et al., 2007). O coelho-bravo desempenha na Península Ibérica um importante papel cultural e económico, sendo caçado desde setembro a dezembro em todo o país.

Monterroso *et al.* (2016) descreveram o impacto do RHDV2 em duas populações de coelhos bravos que sofreram um declínio de 60-70% e a associação deste declínio à diminuição de cerca de 65,7% do icónico lince ibérico e à redução de 45,5% da fecundidade da águia imperial espanhola. O declínio de coelho selvagem tem interferido com outras cadeias tróficas levando a que os seus predadores tenham necessidade de encontrar presas alternativas para a sobrevivência, como o sardão (*Lacerta lepida*) (Eng. Ricardo Paiva, (INIAV), *comunicação pessoal*).

2.14. Perspetivas de controlo da doença e do declínio do coelho

O desenvolvimento de vacinas comerciais eficientes que protegem totalmente contra a doença permitiram o seu controlo em cunicultura industrial (Lavazza & Capucci, 2012). Apesar das populações de coelho terem diminuído drasticamente (> 90%) desde o século passado (Delibes-Mateos et al., 2009; Ferreira and Delibes-Mateos, 2010), têm sido observadas tendências positivas em habitats com estrutura e alimento favoráveis e solos suaves propícios à escavação (Calvete, 2006; Delibes-Mateos et al., 2009; Ferreira, 2012).

Utilizando um modelo simplista, Calvete et al. (2005), demonstrou que o impacto da caça na dinâmica populacional é principalmente determinado pelo nível de seleção daquela, nomeadamente sexual e etária. A caça é realizada em parte durante a época reprodutiva e pode, por isso, conduzir à redução do tamanho da população reprodutora desse ano bem como ao abate de fêmeas em gestação (Calvete et al., 2005). A reprodução nessa espécie é adaptada para otimizar o uso dos recursos alimentares em ambientes variáveis. Esta adaptabilidade permitiu a disseminação do coelho em vários ecossistemas de regiões temperadas e mediterrâneas em

todo o mundo (Tablado et al., 2009). Os surtos de DHV são epizooticos e sazonais em algumas populações de coelho-bravo, sendo que, em regiões frias da Austrália o vírus é menos efetivo como agente de biocontrole do que nas regiões secas (Cooke & Fenner, 2003).

Quando a DHV emerge na indústria, a vacinação é um dos primeiros procedimentos recomendados para controle da doença, mas a implementação de medidas sanitárias é o procedimento mais comumente adotado. As medidas de controle recomendadas pela OIE incluem a occisão de emergência da totalidade das populações afetadas, sendo recomendado um vazio sanitário durante o período mínimo de 4 semanas. Coelhos “sentinela” deverão ser introduzidos em pequenos números antes do repovoamento completo (Argüello-Villares, 1991). Contudo, as medidas de controle sanitário têm provado ser insuficientes porque não impedem os surtos de DHV mesmo em estabelecimentos de reprodução intensiva, reforçando a necessidade da vacinação (Argüello-Villares, 1991).

Cerca de 15 anos após a utilização da estirpe *Czech CAPM-v351* como agente de biocontrole na Austrália, começou a ocorrer recuperação das populações de coelhos (Saunders et al., 2010), devendo-se potencialmente, ao desenvolvimento de imunidade protetora para esta Estirpe (Mutze et al., 1998; Cooke et al., 2000; McPhee et al., 2009), desenvolvimento de resistência genética ao vírus (Nyström et al., 2011; Elsworth et al., 2012) ou devido à presença de calicivírus não patogênicos, funcionando como vacina natural imperfeita (Strive et al., 2009, 2013).

A imunidade humoral é muito importante para proteger os coelhos da DHV (Argüello-Villares, 1991; Lauren, Vautherot, Madelaine, Le Gall & Rasschaert., 1994) e os anticorpos IgG maternos, adquiridos durante a fase tardia da gestação por via placentária, ou através do colostro (Lorenzo Fraile, *comunicação pessoal*), podem ser relevantes para a resistência dos juvenis (Cooke, 2002). Estas IgG podem persistir até às 12 semanas de idade (Cooke, 2002).

No caso do RHDV, os animais podem sobreviver, quando infetados por estirpes menos virulentas, resultantes das populações virais com grande heterogeneidade genética (em alguns casos referidas como quasiespécies) gerada durante a replicação, como resultado da incorporação incorreta de nucleotídeos pela RNA polimerase. Em alguns casos, a substituição de um ou alguns nucleótidos leva à produção de estirpes virais atenuadas ou contrariamente, a um incremento das características de virulência ou a facilidade de transmissão (Kinney, Tsuchiya, Sneider & Trent., 1992; Domingo et al., 1998; Wang et al., 1999; De Lamballerie et al., 2008).

Diversos estudos epidemiológicos de campo na Austrália demonstraram que na maioria das populações de coelhos, os episódios de DHV ocorrem anualmente, ou ocasionalmente a cada dois anos, apesar do seu impacto nas populações ser bastante variável de acordo com a região

geográfica (Henzell, Cunningham & Neave., 2002). Estas diferenças são em parte explicadas pela presença de calicivírus não patogénicos do coelho, mais prevalente nas zonas húmidas e frias do sudeste e sudoeste da Austrália. Estes vírus apatogénicos imunizam parcial e temporariamente os coelhos contra o impacto da DHV (Jahnk, Holmes, Kerr & Wright, 2010; Liu et al., 2012; Strive et al., 2013).

A situação epizootica criada com o aparecimento do RHDV2 levou à produção urgente de novas vacinas inativadas e à autorização provisória de utilização destas nos Estados membros da União Europeia.

Enquanto a vacinação comercial foi de extrema importância na cunicultura industrial, a vacinação de coelhos-bravos é económica e logisticamente impraticável (Abrantes & Esteves, 2010). Diferentes técnicas de gestão são testadas atualmente para tentar reverter o declínio do coelho-bravo, com ajustes na pressão cinegética, controlo de predadores, manejo de habitat, repovoamentos, vacinação e medicação (Ferreira and Delibes-Mateos, 2010). É perceptível que as populações mostram recuperar melhor em zonas de caça sujeitas a boas práticas de gestão, do que em zonas sem regime cinegético (Delibes-Mateos et al., 2009).

2.15. A DHV como modelo animal da Medicina Humana

Tunon et al. (2003) descreveram a DHV como um modelo animal para a insuficiência hepática aguda no homem utilizando a infeção experimental do coelho. A DHV apresenta semelhanças clínicas, anatomopatológicas e quanto ao modo de transmissão em relação à hepatite viral fulminante B, C e E do Homem (Mikami et al., 1999). O intervalo entre a infeção e a morte, permite na maioria dos animais, uma janela terapêutica ampla, sendo este um pré-requisito de um bom modelo animal, permitindo o estudo de diversas opções terapêuticas e monitorização dos seus efeitos. As lesões hepáticas desempenham um papel patogénico central e são histologicamente semelhantes à hepatite fulminante na espécie humana (Mikami et al., 1999). Recentemente, García-Lastra *et al.* (2010) e Tunon, Alvarez, Culebras & González-Gallego (2009) demonstraram que a doença causa uma forma de hepatite viral que partilha muitas características com a hepatite fulminante humana incluindo as hemorragias, encefalopatias e hipertensão intracraniana. Tendo em conta que a infeção pelo RHDV constitui um modelo altamente reprodutível de falência hepática aguda induzida por vírus, é sem dúvida um ótimo modelo para testes de terapêutica de hepato-protetores para esta condição no homem (Tunon et al., 2011).

Capítulo II - Materiais e Métodos

A estratégia metodológica adotada neste trabalho está representada na Figura 9.

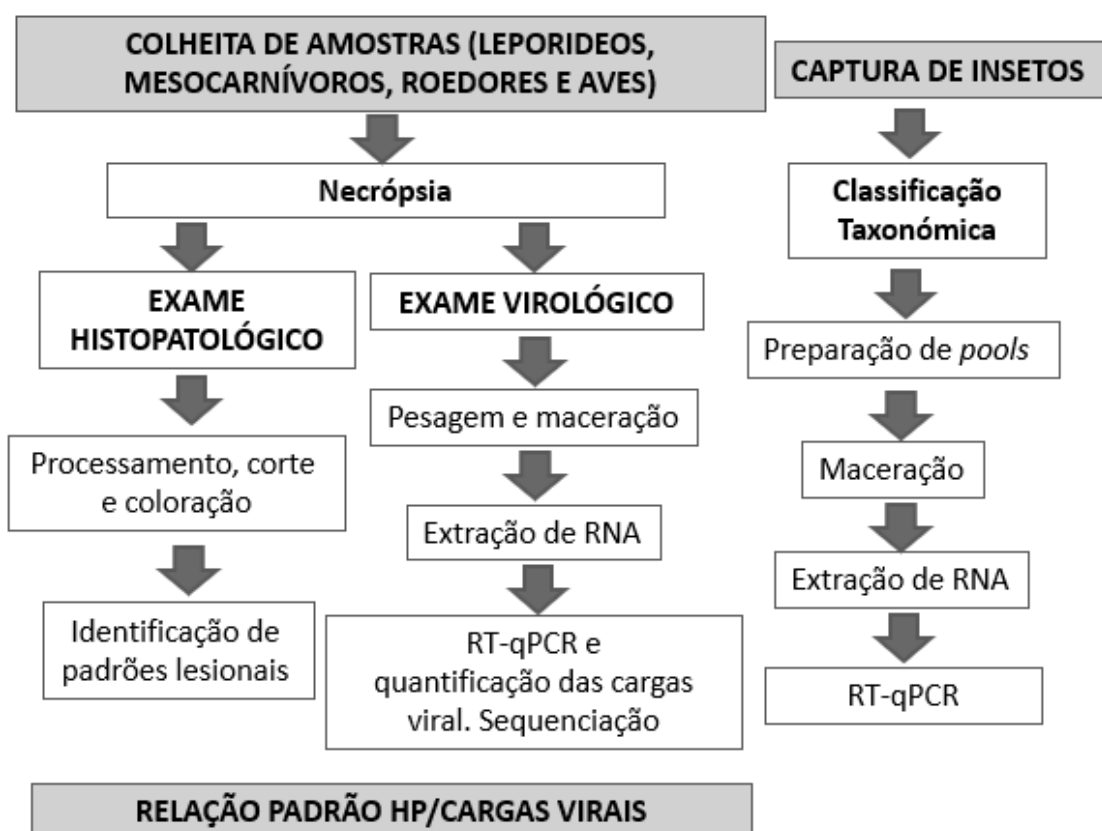


Figura 9 – Resumo da estratégia metodológica adotada no estudo.

1. Origem dos animais. Critérios de inclusão e exclusão

Os animais analisados foram obtidos de várias origens geográficas (Tabela 4) tendo, para tal, sido estabelecido um grupo na rede social Facebook denominado “Recuperação do Coelho-Bravo”, em Março de 2017, do qual fazem atualmente parte cerca de 1800 membros, incluindo caçadores, gestores de caça, entre outros. Foi realizado um inquérito preliminar a 200 caçadores registados neste grupo, cujos resultados foram publicados na revista Veterinária Atual, em Maio de 2017 (Abade dos Santos, 2017).

Foi realizado exame de necrópsia a 73 animais, dos quais 49 coelhos-bravos, 2 lebres ibéricas (*Lepus granatensis*), 1 sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), 1 texugo (*Meles meles*), 1 toirão (*Mustela putorius*), 18 roedores (17 *Apodemus sylvaticus* e 1 *Eliomys quercinus*) e 1 pardal-comum (*Passer domesticus*). Os animais foram entregues pelos vários colaboradores no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária à medida que foram sendo encontrados no campo, tendo sido transportados frescos ou congelados, consoante a

rapidez na entrega. Os animais foram sujeitos a uma pré-seleção com base no seu estado de conservação. A ausência de vísceras ou um estado de decomposição avançado que compromettesse o exame histopatológico, levou à rejeição de coelhos-bravos de diferentes origens.

Os coelhos foram classificados como adultos quando a epífise ulnar distal se encontrava completamente ossificada e o seu peso era superior a 800g, correspondendo a uma idade superior a 7 meses (Soriguer, 1980; Alves & Moreno, 1996; Gonçalves et al., 2002). No caso da Quinta dos Penedinhos, onde existe o registo dos nascimentos, a idade é apresentada em dias.

2. Caracterização dos locais de origem da amostra

Os dois locais de colheita que assumiram o papel central neste estudo foram a Quinta dos Penedinhos, em Sintra, e a Herdade do Infantado, em Santarém. No entanto foram também recebidos animais de outros locais, tal como detalhado na Tabela 4.

A Quinta dos Penedinhos (Figura 10), encontra-se localizada numa zona de reserva natural, no concelho de Sintra. Dispõe de condições naturais excepcionais para criação de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*) e dedica-se também à reprodução em cativeiro de Perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*). Está instalada numa área de 8,5 ha com 4.800 m² de edificações onde está implantado um centro cinegético dedicado à reprodução das duas espécies referidas.



Figura 10 – Ortofotomapa da Quinta dos Penedinhos. A área total dos diferentes espaços dedicados à criação de coelho-bravo totaliza 10.000m², compreendendo parques de reprodução/proteção, alimentação e recria.

Dispõe de alvará do ICNF para a reprodução de coelho-bravo e perdiz-vermelha, sendo considerada uma referência nacional de genética do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*

algius). Iniciou a atividade em 2009, e tem obtido em média 500 lóparos, anualmente, dos quais cerca de 325 chegam à idade adulta, situando a taxa de mortalidade anual em cerca de 35%. Os coelhos são alimentados através de um prado permanente suplementado com ração adequada à fase de desenvolvimento ou reprodução em que se encontram.

A Herdade do Infantado (Figura 11), localizada em Samora Correia, no distrito de Santarém, dispõe de 800 ha, dos quais uma parte se encontra vedada a muro em todo o seu perímetro. Encontra-se registada no ICNF como uma zona de caça Turística (processo n.º 4855-ICNF). É nesta porção que, desde abril de 2016, está em curso um projeto de recuperação da população de coelho-bravo. O projeto envolve o levantamento semanal das densidades das populações, a recuperação das condições ecológicas arbustivas e de acesso a água, a implementação de sementeiras artificiais e a construção de vários postos de alimentação e abeberamento artificiais.

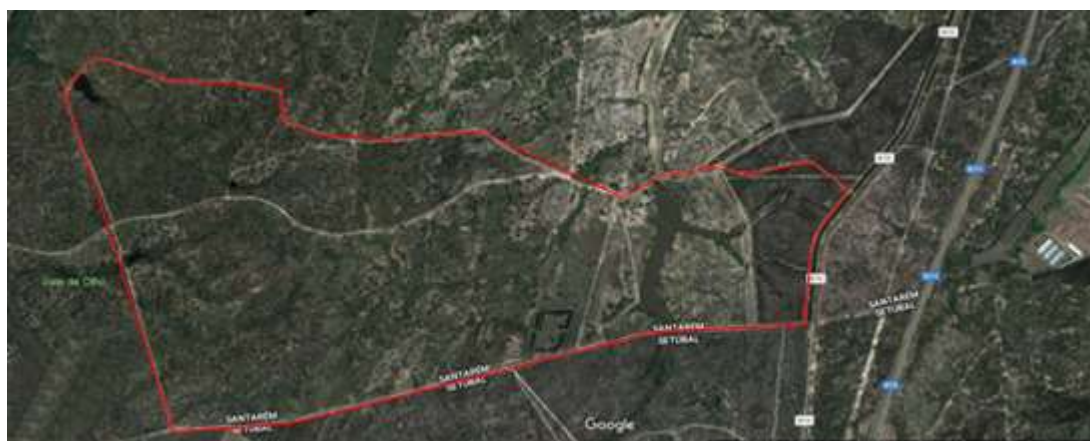


Figura 11 – Ortofotomapa da Herdade do Infantado, Samora Correia. A vermelho encontra-se delimitada a área dedicada à reprodução do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algius*) em ambiente natural.

A população cresceu muito rapidamente e passou de cerca de 50-80 animais em abril de 2016 para um número superior a 500 em abril de 2017, tendo a contagem de tocas ativas passado de 30 para 240 no mesmo intervalo de tempo. Até ao momento da escrita deste documento, os números continuaram a aumentar significativamente. Os animais são diariamente fotografados e filmados por câmaras instaladas em pontos estratégicos da reserva. Existe ainda um controlo muito periódico de predadores e uma vigilância e prospeção diárias de evidências de patologias. Na Tabela 3 são apresentadas as principais diferenças existentes entre a Quinta dos Penedinhos e a Herdade do Infantado que permitiram avaliar aspectos distintos da ecoepidemiologia e dinâmica de transmissão deste vírus.

Tabela 3 - Caracterização dos locais mais significativos de origem da amostra: Quinta dos Penedinhos e a Herdade do Infantado.

DIFERENÇAS ENTRE OS DOIS PRINCIPAIS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DE COELHO-BRAVO			
		QUINTA DOS PENEDINHOS	HERDADE DO INFANTADO
LOCAL		Sintra	Santarém
REGIME		Semi-intensivo	Extensivo
ISOLAMENTO		Vedação (rede)	Área extensiva (murada)
VACINAÇÃO		RHDV, RHDV2 e Mixomatose	-
DESPARASITAÇÃO		Frequente (subcutânea)	Periódica (oral)
ALIMENTAÇÃO		Ração e pastagem	Pastagem e cereais
REGISTO	DE	Detalhado e rigoroso	Dependente da prospeção
MORTALIDADE			

Estes dois locais, pelo tipo de gestão cuidada que têm, permitiram desde o início do presente trabalho o estudo de diferentes fatores e a implementação simultânea de várias metodologias para colheita de insetos, roedores e mesocarnívoros. As diferenças que se encontram resumidas nas Tabela 3, permitem analisar alguns parâmetros da produção que podem influenciar a epidemiologia da doença, com principal enfoque para a vacinação. Os animais que foram recolhidos de outros locais, foram incluídos no estudo por forma a aumentar a amostragem no que toca aos padrões de distribuição viral nas matrizes e lesões histopatológicas, permitindo uma avaliação estatística mais robusta entre animais vacinados e não-vacinados. Tendo em conta que atualmente são muito frequentes os repovoamentos com coelho-bravo em muitas zonas de caça, face a redução drástica dos efetivos das populações selvagens, a hipótese de existirem coelhos vacinados em estado selvagem é elevada. A vacina utilizada para RHDV2 em Portugal, confere uma imunidade de 6 meses, sendo expectável o estabelecimento de imunidade eficaz 7 dias após a vacinação (BRC, 2017). Assim, foi assegurado que os animais incluídos no grupo dos vacinados (VAC) já tinham sido vacinados há mais de 7 dias. Da mesma forma, os animais incluídos no grupo dos não-vacinado (NVAC), provieram de locais onde a vacinação ou repovoamento, não são efetuados, de acordo com o que foi informado pelo gestor da reserva de caça de origem. Sempre que num local ocorreu vacinação ou repovoamento no passado, os animais amostrados só foram incluídos no estudo quando estes atos tinham sido realizados há mais de um ano.

A escala espacio-temporal e o tipo de amostragem está representado na tabela seguinte (Tabela 4).

Tabela 4 – Cronologia da amostragem utilizada neste estudo (data de colheita (ano/mês), local, espécies, número de exemplares).

ANO	2017										2018								
MESES	MAR		ABR		MAI	JUN	JUL	AG	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV						
QUINTA DOS PENEDINHOS																			
ESPÉCIE	Cb		Insetos	Cb	Roedores		Cb						Cb						
N	14		>403	7	14		9						1						
DIAS	8 a 9		7 a 27	9 a 27	27/04 a 10/05								9						
HERDADE DO INFANTADO																			
ESPÉCIE	Cb	Cb	Li	Ixodídeos			Insetos	Cb e Sr			Roedores e Pardal		Cb	Cb	T*				
N	1	5	2	38			>2165	1	1		4	1	2	1	1				
DIAS	1	13 a 15		28			09 a 30	2			14/10 a 04/11		3	24	11				
OUTRAS ORIGENS																			
LOU.				SOU.				CAR.				LOU.				BUC.			
ESPÉCIE	Cb		Cb	Cb			Cb					Cb							
N	1		2	1			2												
DIAS	9		15	18			26					26							
Cb – coelho bravo (<i>Oryctolagus cuniculus algirus</i>); Li – Lebre ibérica (<i>Lepus granatensis</i>); T – Toirão (<i>Mustela putorius</i>); Sr – Sacarrabos (<i>Herpestes ichneumon</i>); T - Texugo (<i>Meles meles</i>). * Animais encontrados perto da Herdade (num raio de 2-10 km exteriores aos seus limites murados. As diferentes espécies foram capturas de acordo com os métodos descritos nos métodos. LOU.-Loures, SOU.-Soure, CAR.-Carreiras (Portalegre), BUC.-Bucelas.																			

3. Critério de grupamento dos animais

Por uma questão de simplificação da identificação dos materiais e maior robustez do tratamento estatístico, os animais foram agrupados em função da sua origem geográfica e temporal e foi-lhes atribuída uma sigla, tal como explicitado na Tabela 5. Os grupos VAC e NVAC, que integram respetivamente, coelhos vacinados e não vacinados para RHDV2, apenas incluíram os animais positivos ao RT-qPCR para Doença Hemorrágica Viral de acordo com os resultados da virologia em seguida apresentados (Tabela 20). Sempre que coelhos, vacinados ou não, apresentaram resultado duvidoso ou negativo ao diagnóstico molecular de RHDV2, foram incluídos, respetivamente nos grupos DUV e Negativo.

Tabela 5 – Grupos de coelhos-bravos de acordo com a origem geográfica e mortalidade correspondentes às amostragens representadas na Tabela 4.

VACINAÇÃO PARA RHDV2	ID DO SUBGRUPO	LOCAL DE ORIGEM	DATA DE MORTALIDADE	N
VAC	QP1	Quinta dos Penedinhos	8/03 a 9/03	14
	QP2	Quinta dos Penedinhos	09/04 a 27/04	7
	QP4	Quinta dos Penedinhos	09/02/18	1
NVAC	HI1	Herdade do Infantado	01/03/17	1
			13-15/03/17	5
			02/07/17	1
	Lou2	Loures, Lisboa	26/05/2017	2
	Plg	Portalegre	18/03/2017	1
	Sou	Soure, Coimbra	15/03/2017	2
	Buc	Bucelas, Lisboa	26/10/2017	2
DUV	QP3	Quinta dos Penedinhos	Junho a Agosto	7
	HI2	Herdade do Infantado	03/12/17	2
	Lou1	Loures	09/03/2017	1
Negativo	HI3	Herdade do Infantado	24/01/18	1
	QP3	Quinta dos Penedinhos	Junho a Agosto	2
Total				49

HI – Herdade do Infantado; QP – Quinta dos Penedinhos; Lou – Lures; Plg – Portalegra; Sou – Soure; Buc – Bucelas;

4. Exames de necrópsia

Os animais que chegaram em boas condições de conservação foram sujeitos a necrópsia no próprio dia, ou no dia seguinte, por forma a assegurar as melhores condições para os exames histopatológicos e virológicos. Os animais entregues congelados ($\approx -20^{\circ}\text{C}$) em sacos de plástico individuais, foram descongelados lentamente a 4°C , cerca de 48h antes da necrópsia. O exame macroscópico foi realizado de acordo com o Manual de Necrópsia Veterinária (Peleteiro et al., 2016). Foi atribuído um código a todos os animais, sendo todos os procedimentos realizados de forma cega até ao momento da análise dos resultados. As necrópsias das lebres, roedores, mesocarnívoros e aves foram efetuadas em separado dos coelhos-bravos, para evitar contaminação.

5. Colheita para análise virológica

Para evitar problemas de contaminação as necrópsias foram realizadas em separado, de acordo com a proveniência e por surto, assegurando uma distância de 10 cm entre cada cadáver. As colheitas de órgãos foram realizadas logo após a exposição das cavidades abdominal e torácica. Foram colhidas oito matrizes para virologia pela seguinte ordem: fígado, baço, rim, pulmão, ventrículo esquerdo, duodeno, fezes e de uma amostra de orelha para análise genética. A sequência escolhida relaciona-se com a ordem pela qual os órgãos se tornam acessíveis durante a necrópsia, visando também a minimização da conspurcação de amostras subsequentes, quer por sangue, quer pelo conteúdo gastro-intestinal. As amostras foram colhidas com recurso a uma lâmina de bisturi esterilizada, distinta para cada matriz, por forma a reduzir a contaminação virológica. Foi assegurada a troca de luvas e material de disseção entre animais. As matrizes foram armazenadas em tubos *eppendorf* de 1,5ml RNase-free a -20°C . Procedeu-se à colheita de 2 amostras de pulmão para utilização do lavado pulmonar, como alternativa a soro sanguíneo, em futuros ensaios de serologia. A colheita das fezes foi realizada através de um corte transversal do recto, e passagem daquelas diretamente para o *eppendorf* através de movimentos realizados sobre o intestino, evitando assim a contaminação dos outros materiais. A colheita do ventrículo esquerdo em detrimento de coração integral teve por objetivo, a obtenção de músculo cardíaco, evitando-se assim a recolha simultânea de sangue, presente nas outras câmaras cardíacas. Estudos prévios, que utilizaram a matriz coração não detalharam este aspecto, sendo portanto questionável a hipótese de contaminação significativa por sangue (Liu, Dang & Wang, 2015). Para as duas lebres-ibéricas (*Lepus granatensis*) foi seguido o mesmo protocolo. No caso dos roedores e mesocarnívoros foram colhidas as mesmas matrizes, embora, numa análise inicial tenham sido apenas utilizados fígado, duodeno e fezes.

6. Colheita para análise histopatológica

Foi realizada a colheita, sempre que possível, dos seguintes órgãos, mesmo que não apresentassem lesões macroscópicas: fígado, baço, duodeno, estômago, rim, coração, traqueia, esófago, pulmão e timo. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% durante pelo menos 72 horas. O processamento foi realizado num aparelho automático do modelo *Leica* TP1020. Os cortes histológicos, com 3 micrómetros de espessura, foram efetuados num micrótomo de *Minot* e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Na avaliação das lesões dos diversos órgãos foram identificados quais os padrões predominantes (Tabelas 9 a 17), permitindo a análise comparativa entre os quadros lesionais histopatológicos identificados nos animais do estudo. A análise histopatológica foi sempre realizada de forma cega, desconhecendo-se a origem do animal ou resultado do diagnóstico molecular. As fotografias foram obtidas com uma câmara digital *Olympus* DP23.

Como grupo de referência para as lesões histopatológicas, foram utilizados órgãos fixados em formol tamponado a 10%, colhidos de quatro coelhos infetados laboratorialmente com RHDV e de quatro coelhos infetados com RHDV2, gentilmente cedidos pelo *Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón*. Os órgãos remetidos constavam de fígado, baço, pulmão, intestino delgado, rim e timo.

7. Captura de roedores

Foram utilizadas doze armadilhas *Sherman* e seis armadilhas *Live* (Figura 12) para a captura indolor de pequenos roedores, utilizando como isco manteiga de amendoim ou isco comercial. As armadilhas foram vigiadas de 8 em 8 horas, tendo sido colocado no seu interior algodão para maior conforto dos animais após a captura. Os animais que foram detetados com vida dentro das armadilhas, foram occisados com recurso a deslocação cervical e mantidos a -20°C em embalagens individuais até ao momento da necrópsia.



Figura 12– Armadilhas para captura de roedores; *Sherman* (à esquerda) e *Live* (à direita) (Fotografias originais do autor)

8. Captura de insetos e sua identificação

Para a captura de insetos foram utilizadas duas armadilhas elétricas de modelo OVI (Figura 13). Estas armadilhas dispõem de luz ultravioleta com ação atrativa, e de uma ventoinha para gerar uma corrente de ar que empura os insetos para dentro de um contentor a seco (não visível na imagem). As armadilhas foram acionadas entre as 20:00h e as 8:00h. Os insetos foram recolhidos todos os dias de manhã e mantidos a -20°C até o momento da identificação. A identificação dos insetos foi feita à lupa, com recurso a diversas chaves taxonómicas disponíveis no Manual de Entomologia de Barrientos (2004).



Figura 13 – Armadilha OVI com lâmpada de luz ultravioleta (Fotografia original do autor).

9. Captura de ixodídeos e identificação

Para a captura de ixodídeos foi utilizado o método da toalha turca (Figura 14), durante as primeiras horas da manhã com captura subsequente por pinça. Os ixodídeos foram depois armazenados a -20°C até o momento da identificação, feita com recurso ao Atlas de Parasitologia Veterinária da FMV-UL (Fonseca et al., 2017). Depois de agrupados taxonomicamente, foram colocados em *eppendorfs* RNase-free e armazenados a -20°C.



Figura 14 – Método de toalha turca para captura de ixodídeos (Fotografia original do autor).

10. Preparação das amostras para os exames virológicos

Uma amostra de cada uma das sete matrizes recolhidas dos coelhos e lebres, e das três matrizes recolhidas dos roedores e mesocarnívoros, foi preparada para extração de RNA viral. Para o efeito, a amostra foi macerada manualmente com recurso a lâmina de bisturi e seguidamente preparado um homogeneizado em tampão fosfato-salino (PBS), a 10% (p/v) no caso dos coelhos, e a 20% (p/v) no caso das outras espécies. Os homogeneizados foram colocados em tubos eppendorf *RNase-free* e armazenados a -80°C. Sempre que possível, foram constituídos *pools* de 10-50 insetos pertencentes à mesma espécie/género ou família, macerados em 400 µl de PBS, utilizando esferas de zircónio num disruptor celular *Fastprep FP120*. Os ixodídeos foram macerados em 400 µl de PBS utilizando esferas de aço inox e o mesmo disruptor celular. No momento da extração, os homogeneizados foram descongelados à temperatura ambiente, clarificados a 3,000g durante 5 minutos e o RNA extraído a partir de 200 µl do sobrenadante, correspondendo a cerca de 20 mg de tecido/material biológico, num extrator automático BioSprint 96 (Qiagen, Hilden, Alemanha) com recurso ao MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen). No total, foram preparadas e extraídas cerca de 420 matrizes. O RNA extraído foi

conservado a -80°C. Foi utilizado o mesmo protocolo de extração para os insetos e para as diferentes matrizes de lebres, mesocarnívoros, roedores e aves.

11. Análise Viroológica

As amostras foram testadas para a presença de RHDV2 utilizando a técnica de RT-qPCR (Duarte et al., 2015), capaz de detectar cerca de 9 moléculas de RNA de RHDV2. Na Tabela 6 lista-se as sequências dos oligómeros (*primers*) e da sonda utilizados, assim com as suas localizações no gene da VP60. Este RT-PCR quantitativo em tempo real gera um fragmento de 127 pb, específico do RHDV2, não detetando portanto as estirpes clássicas (RHDV).

Foram utilizados dois kits de RT-PCR (One-Step RT-PCR (Qiagen) e AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Invitrogen Life Science Technologies)), seguindo-se os protocolos recomendados pelos respetivos fabricantes, sendo as reações efetuadas num volume de reação de 25 µl. O método utilizado foi desenvolvido pelo INIAV para deteção específica de RNA de RHDV2, e encontra-se listado e recomendado no manual da OIE (OIE, 2015b). Para garantir a validação da técnica, foram utilizados controlos onde a amostra teste foi substituída por RNA da Estirpe 1017PT13 (*accession number KJ683896*) (um controlo positivo por ensaio) ou por água PCR-grade (3 a 5 controlos negativos por ensaio). A reação de RT-qPCR foi realizada num sistema de tempo real CFX-96 (Bio-Rad) num formato de placa ótica de 96 poços.

Todos os PCR foram repetidos e validados sempre que os resultados não foram consistentes. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram fluorescência ou cujo valor de Cq foi superior a 38,0 (valor de *cut-off* previamente estabelecido para limite de positividade). No âmbito deste estudo, os resultados foram também considerados negativos mesmo com valores ligeiramente abaixo de Cq 38 (Cq >36) quando o valor de fluorescência basal foi baixo (<500) e a curva apresentou uma forma não sigmóidal (*e.g.* de rampa), reveladora de que a fluorescência não aumentou de forma exponencial, expectável numa reação de amplificação pela polimerase. Uma vez que todos as matrizes foram processadas nas mesmas condições, e para maior facilidade na análise, foram utilizados os valores de Cq e não as cargas virais. No entanto, para proporcionar ao leitor uma ideia dos seus significados, apresentam-se de seguida alguns valores, cujo cálculo considerou o fator de diluição dos macerados (10%), a quantidade de sobrenadante extraído (200µl), o volume de eluição dos ácidos nucleicos (100µl), o volume utilizado na reação de PCR (10µl) e se referem a cargas virais prováveis por mg de tecido, órgão ou fezes: Cq 15 (1,99E+09); Cq 20 (2,87E+08); Cq 30 (2,31E+05); Cq 35 (9,93E+03).

Tabela 6 – Características dos oligómeros e sonda utilizados na técnica de RT-PCR em tempo real.

Oligómero	Sequência de nucleótidos (5' - 3')	Tamanho do amplicon	Posição no gene da VP60
RHDV2-F	TGGAACCTTGGCTTGAGTGTTGA	127	1571–
RHDV2-R	ACAAGCGTGCTTGTGGACGG		1592–
			1678–
			1697
Sonda	FAM-TGTCAGAACTTGTTGACATCCGCCC-TAMRA	-	1664–
			1640

Adaptado de Duarte et al. (2015)

Para confirmar a presença do RHDV2 e simultaneamente descartar a eventual co-presença de RHDV, foi também realizado um RT-PCR convencional numa subamostragem do surto QP1. Este RT-PCR, dirigido para a região terminal do gene *vp60*, permite amplificar um fragmento de 384 pb tanto em estirpes de RHDV como em estirpes de RHDV2. Primeiramente foi realizada a síntese de cDNA utilizando um oligo dT como primer (dado que o RNA viral é poliadenilado) e o kit para transcrição reversa *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific™) nas condições indicadas pelo fabricante. De seguida, foi realizado um PCR utilizando o par de primers, RC9F e RC10R (tabela 7) e o kit comercial *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Thermo Scientific®) nas condições indicadas pelo fabricante. O produto do PCR foi corrido em gel de agarose a 2% (m/v) em Tampão TBE (Tris, borate and EDTA), onde foi previamente incorporado GelRed (Biotium) para visualização dos fragmentos de DNA sob luz ultravioleta. A electroforese destes fragmentos foi efectuada em paralelo com um marcador comercial de massas moleculares conhecidas (1 kb DNA ladder, SIGMA). As bandas correspondendo ao tamanho esperado foram purificadas utilizando o KIT NZYTech-column de acordo com as instruções do fornecedor. O DNA purificado foi sequenciado pelo método de Sanger, utilizando o KIT comercial *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Life technologies, Foster City, CA) num *Automated 3130 Genetic Analyzer system* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências parciais obtidas, editadas no programa SeqEd, bem como a homologia encontrada contra uma base de dados pública (GenBank) estão presentes na Tabela 1 do Anexo II.

Tabela 7– Par de oligómeros utilizados para confirmação e posterior sequenciação do vírus de RHDV e RHDV2.

Oligómero	Orientação	Sequência de nucleótidos (5' - 3')	Amplicon	Posição 5' no genoma	Posição 5' no gene VP60
RC-9	Sense	ATCATGTTTCGCGTCTGTCGTCAGG	384 pb	6685	1381
RC-10	Antisense	GCGCCTGCAAGTCCCAATCC		7071	27nt*

Adaptado de Tham et al. (1999) & Duarte et al. (2015). Foi utilizada como referência a estirpe RHDV-N1.

* a jusante do codão stop TGA

12. Análise Estatística

A distribuição dos dados obtidos para os diferentes grupos de amostragem foi analisada utilizando o *software* IBM SPSS Statistics 25, tendo sido observada a ausência de distribuição normal. Assim, todo o tratamento dos dados foi realizado com recurso a testes não paramétricos. A análise comparativa de prevalências foi realizada utilizando o teste exato de *Fisher* (Tabela 18). Na análise das variáveis relacionadas (*e.g.* matrizes do mesmo animal) foi utilizado o teste *Related-Samples Wilcoxon Signed Rank* (Tabelas 21 e 22). Na análise de variáveis independentes (*e.g.* valores de Cq dos diferentes animais) foi utilizado o teste *Independent-Samples Mann-Whitney U* (Tabela 23). Tendo em conta a amostra reduzida foi assumido o nível de significância para o teste bilateral. O valor de *p* apresentado corresponde a um nível de significância de 95%.

Capítulo III – Resultados

1. Exames de necrópsia

Os resultados do exame de necrópsia encontram-se resumidos na Tabela 8. Os animais encontram-se agrupados de acordo com o estabelecido na Tabela 5.

Tabela 8– Resumo das alterações macroscópicas encontradas à necrópsia dos coelhos-bravos.

GRUPO	LESÕES OBSERVADAS
QP1 (n=14)	Apenas em três animais (21%) foram encontradas lesões macroscópicas normalmente encontradas na DHV: fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins.
QP2 (n=7)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão (Anexo III).
QP3 (n=7)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins presentes, mas em muito baixo grau (1-3 focos de hemorragia/órgão).
QP4 (n=1)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.
Plg (n=1)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.
Lou1 (n=1)	Não foi encontrado um padrão de DHV, o animal estava num estado de caquexia avançado (1 em 5 na escala de CC). Conspuração dos membros posteriores e região perianal. Foram encontrados oocistos de <i>Eimeria</i> spp ao esfregaço, > 50 oocistos/campo de grande ampliação – coccidiose intestinal.
Lou2 (n=2)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.
HI1 (n=7)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.
HI2 (n=2)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins, mas em muito baixo grau (1-3 focos de hemorragia/órgão).
HI3 (n=1)	Não foram observadas lesões macroscópicas.
Sou (n=2)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.
Buc (n=2)	Fígado pálido e friável, lesões congestivo-hemorrágicas no baço, pulmão, fígado e rins ocupando > 50% da extensão do órgão.

QP-Quinta dos Penedinhos, Lou-Loures, HI- Herdade do Infantado, Sou-Soure, Buc-Bucelas, Plg – Portalegre; n-amostragem

2. Histopatologia

2.1. Padrões lesionais histopatológicos estabelecidos

Os padrões lesionais identificados na sequência da análise histopatológica dos cadáveres necropsiados, foram normalizados para cada órgão como se descreve nas Tabelas 9 a 17.

Tabela 9 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o fígado.

Fígado	Padrões não necróticos	F#1 – Congestão discreta. (Figura 15).
		F#2 – Congestão marcada a severa com distensão dos sinusóides. (Figura 16).
		F#3 – Degenerescência vacuolar dos hepatócitos (Figura 17).
	Padrões necróticos	F#4 - Necrose difusa dos hepatócitos alternando com zonas de vacuolização. As células necrosadas apresentam acidofilia do citoplasma e núcleo em cariorrexia (Figura 18).
		F#5 – Zonas de necrose acelular alternando com zonas de picnose e eosinofilia dos hepatócitos (Figura 19).
		F#6 – Necrose difusa dos hepatócitos com eosinofilia do citoplasma. Mais de 50% das células exibem núcleo, estando este picnótico. Sem padrão zonal, mantendo a arquitetura trabecular (Figura 20).
		F#7 – Necrose difusa grave generalizada dos hepatócitos com dissociação das trabéculas. Menos de 50% dos hepatócitos exibem núcleo, estando este picnótico (Figura 21).

Tabela 10 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o pulmão.

Pulmão	Congestão e edema são predominantes	P#1 – Edema alveolar focal ou difuso, com ou sem congestão (Figura 22).
		P#2 – Congestão e edema alveolar. Hemorragia intralveolar em focos (Figura 23).
		P#3 – Congestão muito marcada dos capilares alveolares. Zonas restritas de espessamento dos tabiques interalveolares com atelectasia moderada a severa. Pneumonia intersticial focal.
	Congestão e edema não são predominantes	P#4– Espessamento dos tabiques interalveolares, por vezes com infiltração de células mononucleadas. Edema alveolar e/ou congestão. Pode estar presente atelectasia de vários graus. Pneumonia intersticial difusa (Figura 24).
		P#5 – Granuloma de centro necrótico, formado por células epitelióides, eosinófilos e células gigantes multinucleadas.

Tabela 11– Padrões histopatológicos estabelecidos para o traqueia.

Traqueia	T#1 – Sem alterações significativas (Figura 25).
	T#2 – Congestão da lâmina própria da mucosa.
	T#3 – Edema muito acentuado da lâmina própria, com diminuição marcada do lume. Os vasos linfáticos e capilares sanguíneos surgem extraordinariamente distendidos (Figura 26).
	T#4 – Hemorragia difusa da lâmina própria (Figura 27).

Tabela 12– Padrões histopatológicos estabelecidos para o intestino delgado.

Intestino Delgado	ID#1 – Descamação do epitélio das vilosidades que surgem discretamente deformadas.
	ID#2 – Descamação do epitélio e das vilosidades, estando estas, curtas e deformadas. Infiltração da lâmina própria por células mononucleadas.
	ID#3 – Necrose quase total da mucosa sendo apenas evidentes algumas glândulas dispersas. Hipertrofia do GALT.

Tabela 13 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o coração.

Coração	C#1 – Sem alterações significativas.
	C#2 – Presença de serosidade acumulada entre as fibras. Degenerescência granulosa dos cardiomiócitos, com perda da estriação (Figura 28).

Tabela 14 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o baço.

Baço	Lesões congestivas ou edematosas	B#1 – Zonas de congestão.
		B#2 – Edema da polpa vermelha.
	Hipoplasia linfoide ou necrose	B#3 – Hipoplasia linfoide (Figura 29).
		B#4 – Necrose subcapsular e/ou focos de necrose dispersos.
		B#5 – Necrose da polpa vermelha e necrose discreta das células linfoides dos folículos da polpa branca (Figura 30).
		B#6 – Congestão da polpa vermelha com necrose. Necrose quase total das células linfoides da polpa branca.

Tabela 15 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o estômago.

Estômago	E#1 – Sem alterações significativas.
	E#2 – Edema da lâmina própria; lesões de necrose focal.

Tabela 16 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o rim.

Rim	R#1 – Distensão dos capilares da cortical e medular (Figura 31).
	R#2 – Acidofilia discreta das células tubulares.
	R#3 – Glomerulite trombosante praticamente generalizada. Discreta degenerescência granular das células tubulares (Figura 32).
	R#4 – Congestão. Discreta distensão tubular na cortical com presença de serosidade levemente acidófila. Os tubos medulares surgem com severa atrofia do epitélio e retenção de serosidade intraluminal (Figura 33).
	R#5 – Necrose difusa do epitélio tubular, principalmente cortical (Figura 34).

Tabela 17 – Padrões histopatológicos estabelecidos para o timo.

Timo	TI#1 – Congestão da cortical ou focos de hemorragia.
	TI#2 – Hipoplasia linfoide (Figura 35).
	TI#3 – Necrose focal a generalizada (Figura 36).

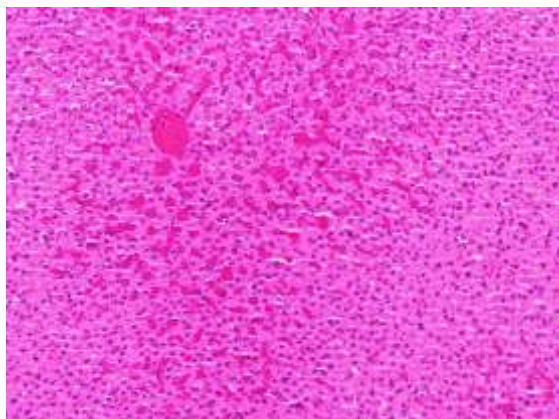


Figura 15 – Fígado - Padrão F#1 (H&E, 100x)

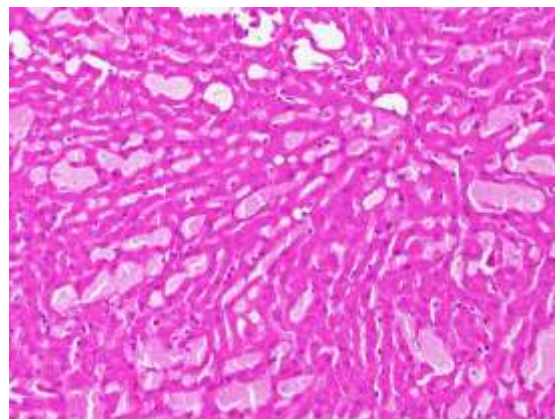


Figura 16 – Fígado - Padrão F#2 (H&E, 100x)

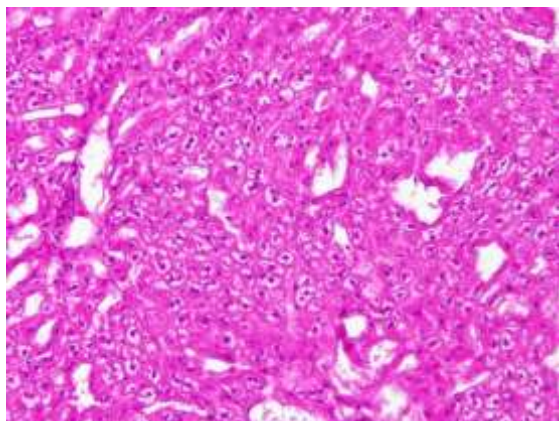


Figura 17 – Fígado - Padrão F#3 (H&E, 100x)

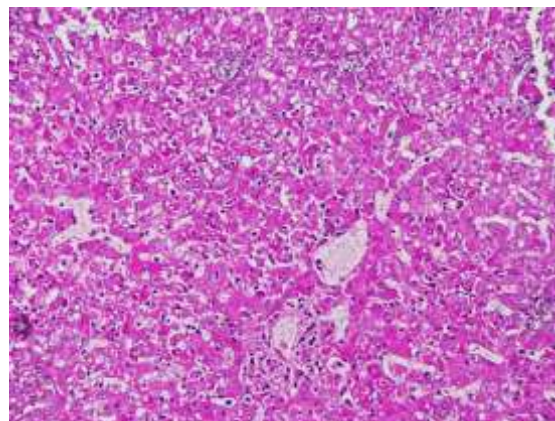


Figura 18 – Fígado - Padrão F#4 (H&E, 100x)

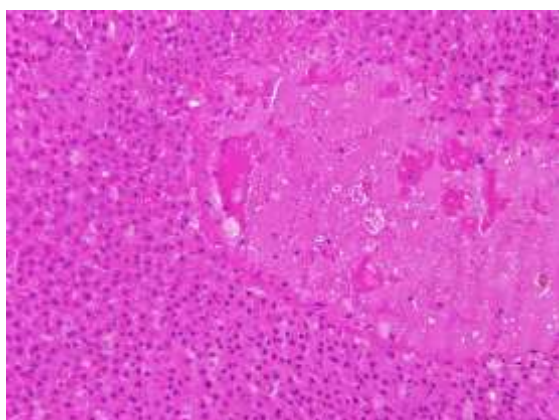


Figura 19 – Fígado - Padrão F#5 (H&E, 100x)

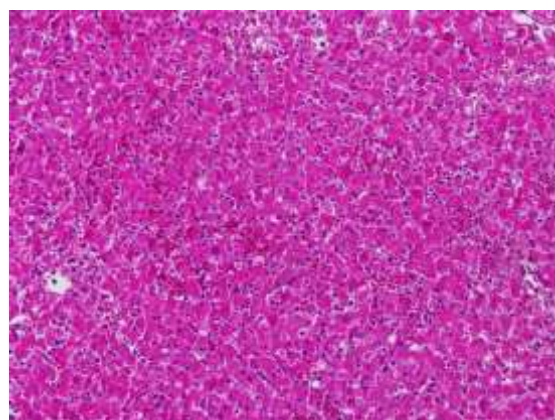


Figura 20 – Fígado - Padrão F#6 (H&E, 100x)

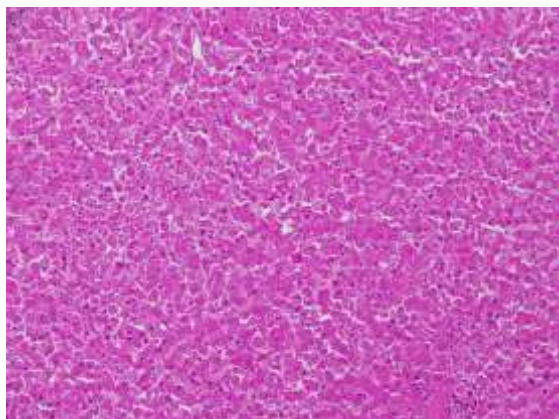


Figura 21 – Fígado - Padrão F#7 (H&E, 100x)

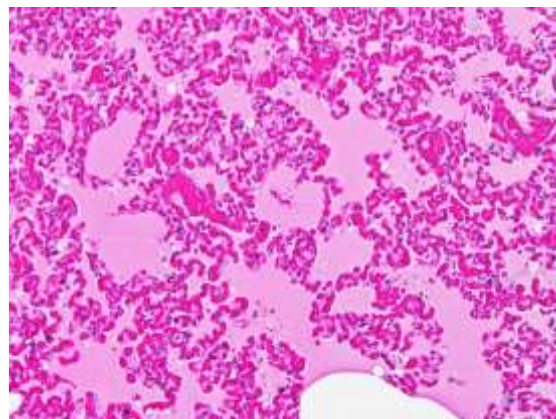


Figura 22 – Pulmão - Padrão P#1 (H&E, 100x)

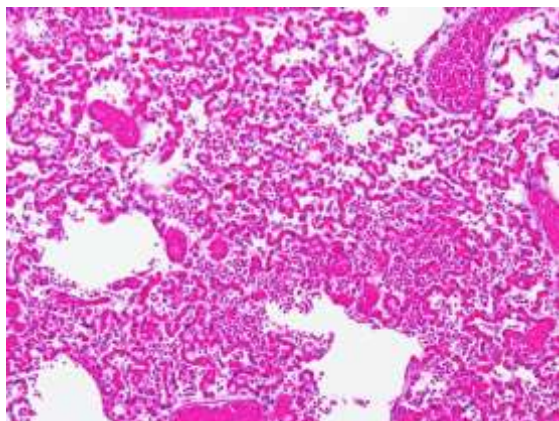


Figura 23 – Pulmão - Padrão P#2 (H&E, 100x)

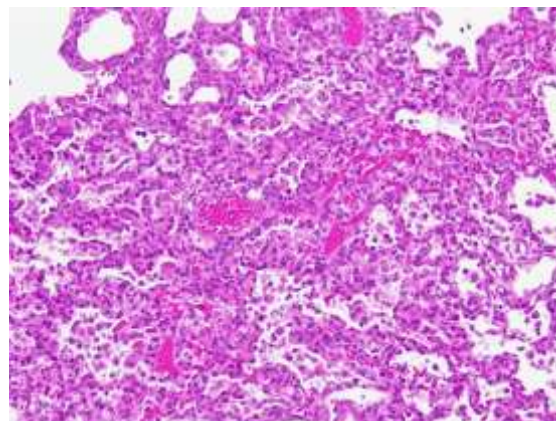


Figura 24 – Pulmão - Padrão P#4 (H&E, 100x)

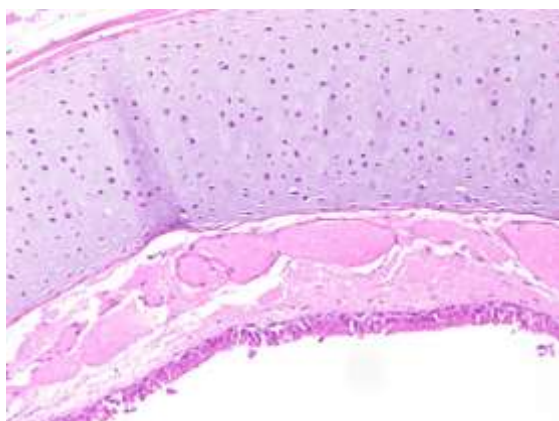


Figura 25 – Traqueia - Padrão T#2 (H&E, 100x)



Figura 26 – Traqueia - Padrão T#3 (H&E, 100x)



Figura 27 – Traqueia - Padrão T#4 (H&E, 100x)

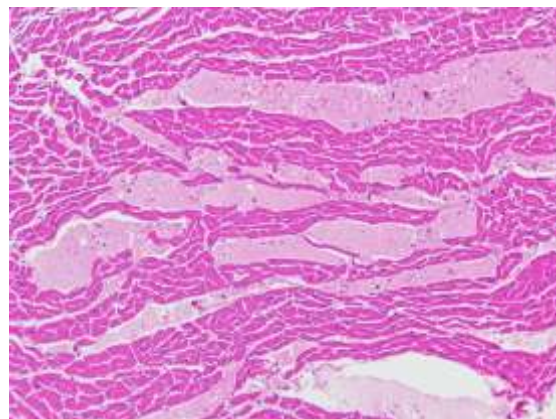


Figura 28 – Coração - Padrão C#2 (H&E, 100x)

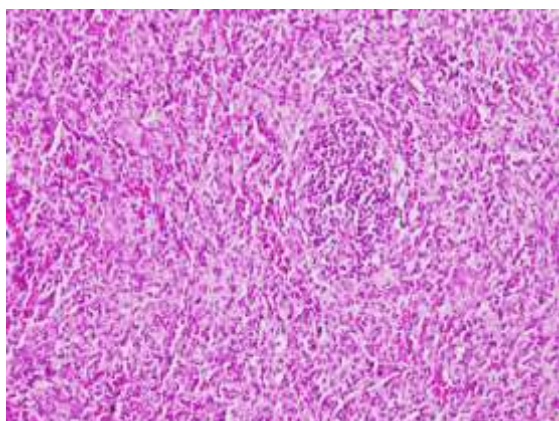


Figura 29 – Baço - Padrão B#3 (H&E, 100x)

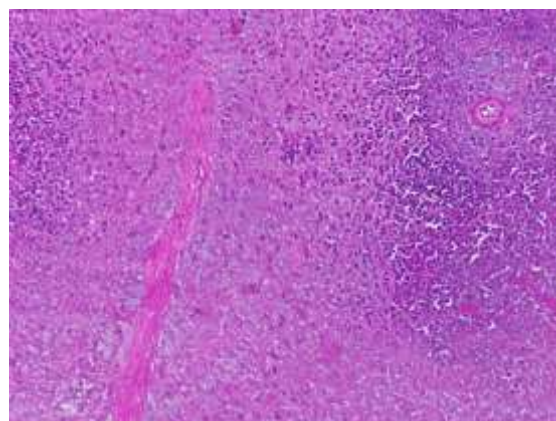


Figura 30 – Baço - Padrão B#5 (H&E, 100x)

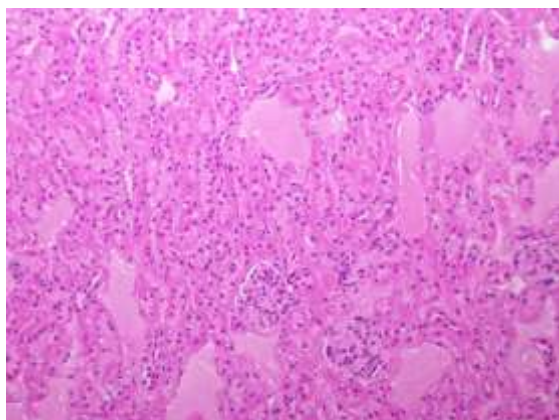


Figura 31 – Rim - Padrão R#1 (H&E, 40x)

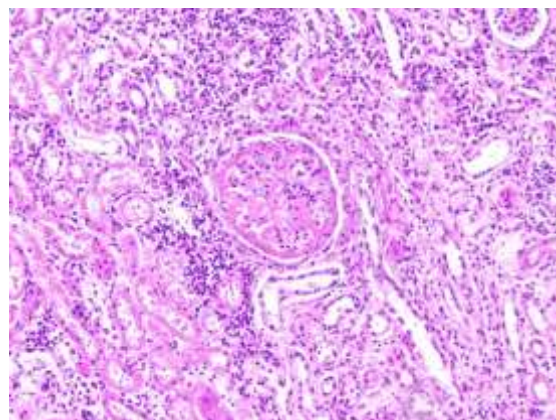


Figura 32 – Rim - Padrão R#3 (H&E, 100x)

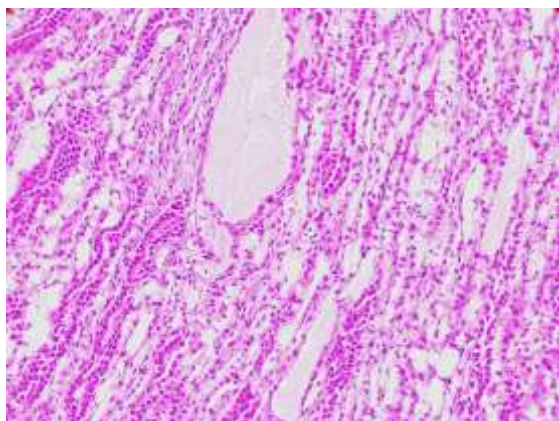


Figura 33 – Rim - Padrão R#4 (H&E, 100x)

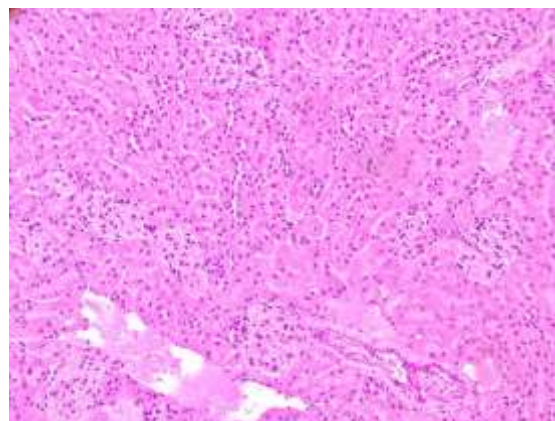


Figura 34 – Rim- Padrão R#5 (H&E, 40x)

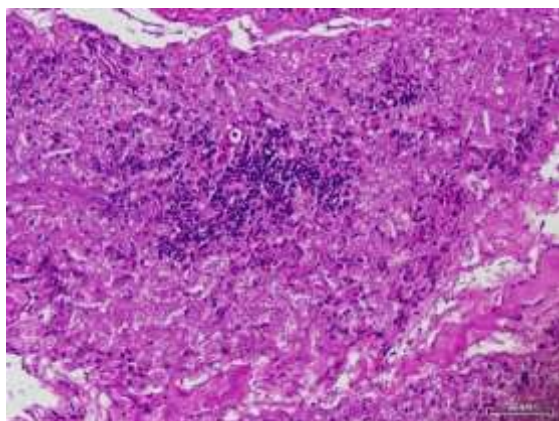


Figura 35 – Timo – Padrão TI#2. (H&E, 40x)

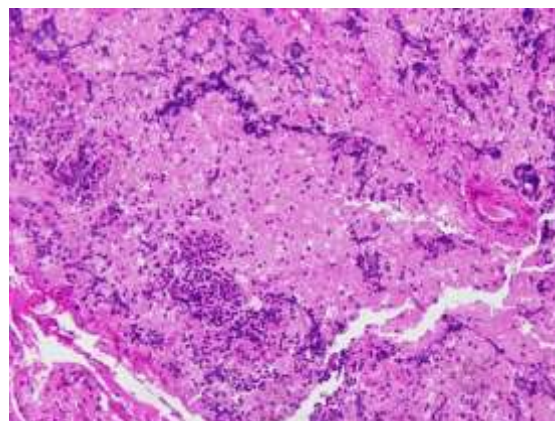


Figura 36 – Timo – Padrão TI#3. (H&E, 40x)

2.2. Distribuição da frequência dos diferentes padrões histopatológicos

2.2.1. Animais infectados naturalmente

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da distribuição dos padrões lesionais dos diferentes órgãos no grupo VAC e NVAC (descritos na Tabela 5). É apresentado o resultado da análise comparativa entre estes dois grupos através do valor de p . Em algumas situações, foi encontrado mais do que um padrão no mesmo órgão tendo sido todos apresentados na Tabela 18.

É apresentada ainda a distribuição dos mesmos padrões lesionais no grupo de coelhos com resultado duvidoso ao RT-qPCR.

Não se identificaram lesões histopatológicas no pâncreas, esôfago e estômago passíveis de serem associadas a lesão induzida pela DHV, pelo que não se apresentam dados relativos a estes órgãos.

Tabela 18– Distribuição dos diferentes padrões lesionais nos órgãos analisados nos grupos de coelhos-bravos vacinados (VAC) e não-vacinados (NVAC) e análise comparativa da frequência de cada padrão entre os dois grupos.

GRUPO (n)	PADRÕES LESIONAIS DO FÍGADO						
	F#1	F#2	F#3	F#4	F#5	F#6	F#7
VAC (21)	1	4	2	1	4	7	2
NVAC (15)	0	1	1	0	0	4	11
p value	1,000	0,376	1,000	1,000	0,125	0,142	0,001**
DUV (10)	0	0	1	0	2	0	7
	PADRÕES LESIONAIS DO PULMÃO						
	P#1	P#2	P#3	P#4	P#5		
VAC (21)	8	4	7	1	1		
NVAC (15)	7	3	0	5	0		
p value	0,736	1,000	0,027*	0,028*	1,000		
DUV (10)	8	2	0	0	0		
	PADRÕES LESIONAIS DA TRAQUEIA						
	T#1	T#2	T#3	T#4			
VAC (21)	16	3	3	0			
NVAC (15)	4	0	8	3			
p value	0,006**	0,025*	0,025*	0,064			
DUV (10)	1	0	8	1			
	PADRÕES LESIONAIS DO RIM						
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#5		
VAC (21)	2	15	0	2	3		
NVAC (15)	0	5	6	1	5		
p value	0,500	0,041*	0,003**	1,000	0,236		
DUV (10)	0	2	0	0	8		
	PADRÕES LESIONAIS DO BAÇO						
	B#1	B#2	B#3	B#4	B#5	B#6	
VAC (21)	1	0	11	2	3	6	
NVAC (15)	0	1	3	0	10	1	
p value	1,000	0,417	0,083	0,500	0,002**	0,200	
DUV (10)	0	2	5	0	3	0	
	PADRÕES LESIONAIS DO TIMO						
	SAS	TI#1	TI#2	TI#3			
VAC (21)	5	14	2	0			
NVAC (15)	6	0	4	5			
p value	0,465	<0,001**	0,210	0,008**			
DUV (10)	1	0	7	2			
	PADRÕES LESIONAIS DO DUODENO						
	SAS	ID#1	ID#2	ID#3			
VAC (21)	0	14	4	4			
NVAC (15)	1	0	7	7			
p value	0,417	<0,001**	0,141	0,141			
DUV (10)	0	6	4	0			
	PADRÕES LESIONAIS DO CORAÇÃO						
	SAS	C#1					
VAC (21)	0	21					
NVAC (15)	2	13					
p value	0,167	<0,001**					
DUV (10)	0	10					

p value* < 0,05. *p value* < 0,01. VAC – coelhos vacinados para RHDV e RHDV2; NVAC – coelhos não vacinados para RHDV e RHDV2. DUV – coelhos com resultado duvidoso ao RT-qPCR. SAS – sem alterações significativas exceto as decorrentes do processo de autólise. Em algumas situações foram observados dois padrões em simultâneo no mesmo órgão.

2.2.2. Animais infectados laboratorialmente

Na Tabela 19, encontram-se resumidos os padrões de lesão histopatológica identificados nos 4 coelhos infectados laboratorialmente com RHDV2/b e nos 4 coelhos infectados com RHDV, cedidos pelo *Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CIITA)* (Aragón, Espanha).

Tabela 19 – Distribuição dos diferentes padrões de lesão histopatológica presentes em coelhos infectados laboratorialmente com RHDV2/b ou RHDV.

PADRÃO DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA							
Estirpe de vírus	Idade (semanas)	Fígado	Baço	Pulmão	Timo	Intestino delgado	Rim
RHDV2 (n=4)	4,5-15,5	F#4 (25%)	B#1 (25%)	P#1 (75%)	TI#2.	ID#1	R#4
		F#6 (25%)	B#5 (75%)	P#4 (25%)		(25%)	(100%)
		F#7 (50%)				ID#3 (75%)	
RHDV (n=4)	4,5-10,5	F#4	B#1(25%),	P#3 (75%)	TI#1	ID#1	R#3 (75%)
		(100%)	B#5	P#6 (25%)		(50%)	R#4 (25%)
			(50%), B#6 (25%)			ID#2 (50%)	

RHDV2/b – *rabbit haemorrhagic disease virus 2*; RHDV – *rabbit haemorrhagic disease virus*. É apresentado o padrão de lesão histopatológico, de acordo com as Tabelas 9 a 17 e a sua percentagem relativa na amostra.

3. Resultados de Virologia

3.1. Estudo comparativo de 4 kits de RT-PCR

De forma a avaliar a robustez do método de deteção usado, procedeu-se a um estudo comparativo dos valores obtidos com 4 kits comerciais RT-qPCR disponíveis no mercado. Utilizou-se a mesma preparação de RNA, previamente testada positiva a RHDV2. Não se observaram diferenças significativas entre os vários kits (Figura 37), no sentido em que todos detetaram o RNA viral, embora com níveis de fluorescência um pouco variáveis. Em alguns kits foi mais evidente o efeito inibidor de excesso de RNA, verificando-se uma redução acentuada nos níveis de fluorescência, embora os valores de Cq tenha sempre aumentado com o fator de diluição.

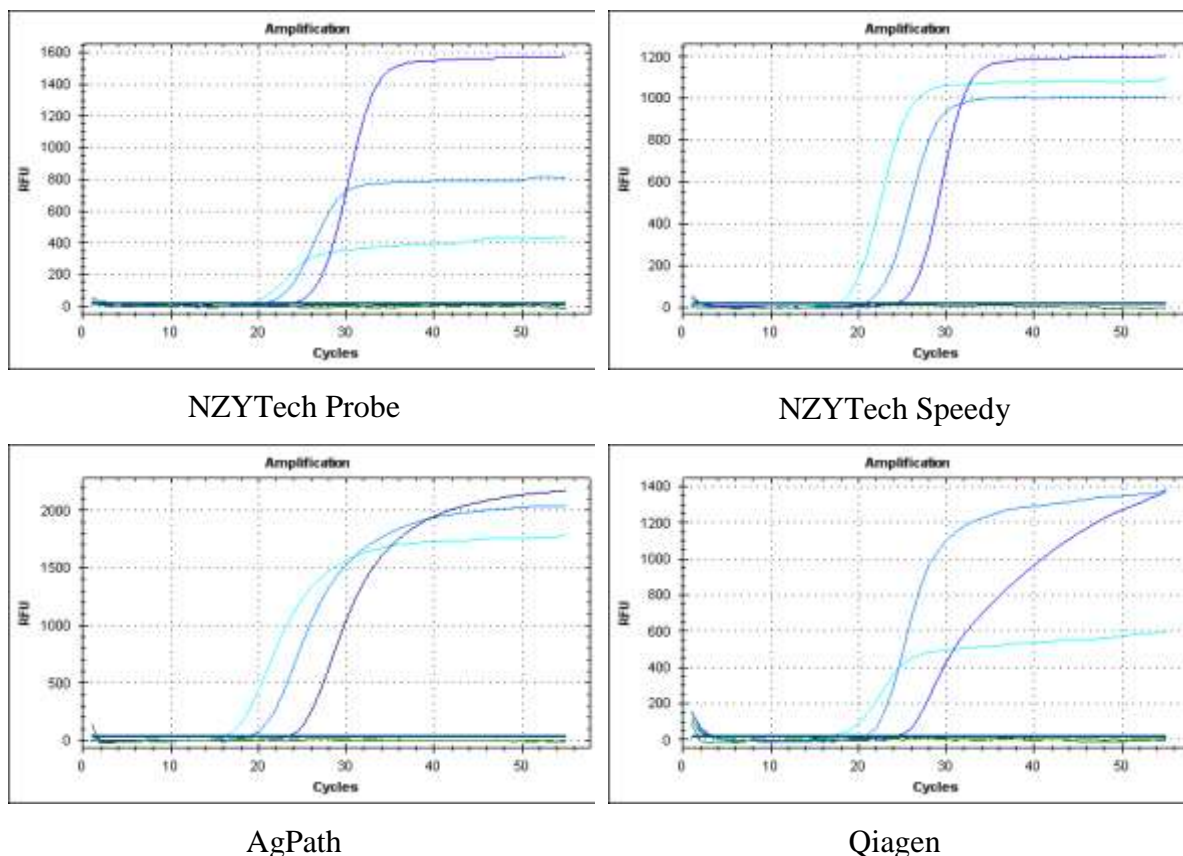


Figura 37 – Resultados do RT-qPCR para detecção de RHDV2 (Duarte *et al.*, 2015) obtidos com 4 kits comerciais. Do azul mais claro para o azul mais escuro, foi utilizada respectivamente, a mesma preparação de RNA viral em natureza, na diluição 1/10 e na diluição 1/100. Por esta sequência referida, obtivemos os valores de C_q com o NZYTech Probe: 19,59, 21,16 e 24,42; com o NZYTech Speedy: 18,08, 21,07 e 24,75; com o AgPath: 16,10, 18,73 e 23,11 e com o Qiagen: 17,26, 20,87 e 24,32.

3.2. Resultados do RT-qPCR dos coelhos positivos

Os animais contemplados na descrição da amostragem (Tabela 4) que apresentaram um valor de C_q > 38,00 em todas as matrizes (negativos para RHDV2 ao RT-qPCR) foram excluídos dos grupos de surto correspondentes (Tabela 5). Os animais que apresentaram valores de C_q > 35,00 e inferior a 38,00 em pelo menos uma matriz, bem como apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com DHV foram considerados duvidosos para RHDV2 e agrupados em separado (secção 3.3) e submetidos a análises adicionais no sentido de esclarecer o diagnóstico final. Os animais foram classificados como positivos para RHDV2 quando os resultados de RT-qPCR nas 7 matrizes apresentaram valor de C_q < 35,00 ou sempre que se observou valores de C_q < 25,00 no fígado, baço e/ou pulmão. Na Tabela 20 encontra-se o resumo dos resultados obtidos no RT-qPCR com as diferentes matrizes. É apresentado o valor de C_q médio para a matriz de determinado grupo de animais.

Tabela 20 –Resultados de RT-qPCR dos coelhos positivos e duvidosos (Cq<38,00).

GRUPO	NO. DE ANIMAIS	IDADE / FASE	HISTÓRICO DE VACINAÇÃO	VALORES DE CQ (MÉDIOS OU INDIVIDUAIS)						
				FÍGADO	BAÇO	DUODENO	FEZES	RIM	PULMÃO	VENTRÍCULO ESQUERDO
QP1	14	60	RHDV e RHDV2	30,72	30,86	31,85	32,84	33,74	29,36	31,81
QP2	7	75	RHDV e RHDV2	32,38	31,25	31,19	29,83	31,25	29,85	31,40
QP3	7	90-120	RHDV, RHDV2 e Mixomatose (Reforço)	> 38	> 38	> 38	> 38	> 38	>38	>38
				(n = 5)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 5)	(n = 7)	(n = 4)	(n = 2)
				29,035	31,29	32,87	32,88		33,29	29,716
				(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=2)		(n = 3)	(n = 5)
QP4	1	A		13,76	13,04	18,27	21,47	14,11	11,75	17,41
Plg	1	A		36,33	38,01	33,78	38,01	36,44	28,96	34,32
Lou1	1	J		38,01	38,01	38,01	38,01	38,01	36,87	33,93
Lou2	2	A		38,01	38,01	29,79	35,90	32,62	37,45	35,82
HI1	7	3J, 4A		21,05	19,46	23,44	24,14	23,78	21,04	21,80
HI2	2	J		38,01	38,01	38,01	38,01	38,01	35,56	34,25
Sou	2	A		15,99	17,35	16,67	36,95	19,63	27,65	28,72
Buc	2	A		20,08	20,51	23,09	23,10	22,17	20,85	21,06

Os valores apresentados representam médias sempre que se referem a mais do que 1 animal. O significado das siglas atribuídos aos grupos encontra-se descrito na Tabela 5. A – coelho adulto; J – coelho juvenil (ver capítulo II, subcapítulo 1). A cinzento encontram-se assinalados os valores de Cq < 38,01. A idade é apresentada em dias.

Na Figura 38 é apresentado o resultado do PCR em tempo real, de um coelho vacinado positivo para RHDV2. Nas condições utilizadas, o animal apresentou um Cq médio de 33,26.

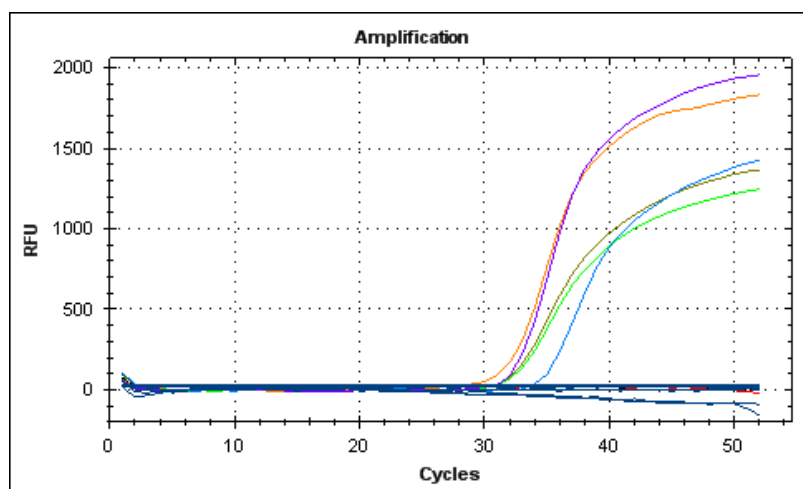


Figura 38 –Resultado do RT-qPCR de um coelho vacinado, positivo para RDHV2. (pulmão (laranja), baço (verde-oliva), rim (turquesa), fígado, sem amplificação (vermelho), ventrículo esquerdo (roxo), duodeno (limão) e fezes, sem amplificação (preto).

Tabela 21 – Valores de Cq encontrados nas diferentes matrizes dos animais vacinados (VAC; n=21).

**ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE Cq DO GRUPO VAC
OBTIDOS NAS DIFERENTES MATRIZES (p-VALUES calculados pelo *Related-Samples
Wilcoxon Signed Rank Test*)**

MATRIZ	FÍGADO	BAÇO	DUODENO	FEZES	RIM	PULMÃO	VENTRÍCULO ESQUERDO
FÍGADO		0,455	0,872	0,856	0,654	0,05*	0,737
BAÇO			0,205	0,263	0,112	0,05*	0,351
DUODENO				0,940	0,455	0,023*	0,931
FEZES					0,794	0,099	0,654
RIM						0,002**	0,305
PULMÃO							0,008**
ANÁLISE DESCRITIVA							
Cq mínimo	13,27	14,17	16,18	21,29	23,82	15,62	26,12
Cq máximo	38,01	38,01	38,01	38,01	38,01	36,08	38,01
Cq médio	31,28	20,64	32,06	32,17	33,40	28,31	32,63
σ	8,01	7,22	5,73	6,46	4,67	5,92	3,70

*p value < 0,05. **p value < 0,01

Na Tabela 21 apresentam-se os resultados da análise estatística comparativa baseada nos valores individuais ou médios de Cq obtidos que refletem as cargas virais sendo a sua relação inversamente proporcional. Foram procuradas diferenças entre os valores de Cq encontrado nas diferentes matrizes de cada coelho do grupo VAC, sendo apresentado o valor de *p*.

Na Figura 38 é apresentado o resultado do PCR em tempo real, de um coelho não vacinado e positivo para RHDV2.

Neste animal, todas as matrizes foram positivas e os valores de Cq baixos (Tabela 19 e Figura 39), muito provavelmente pelo facto de não ter imunidade adquirida por contacto prévio com este vírus (Carvalho et al., 2017a). Nas condições utilizadas, o animal apresentou um Cq médio de 16.

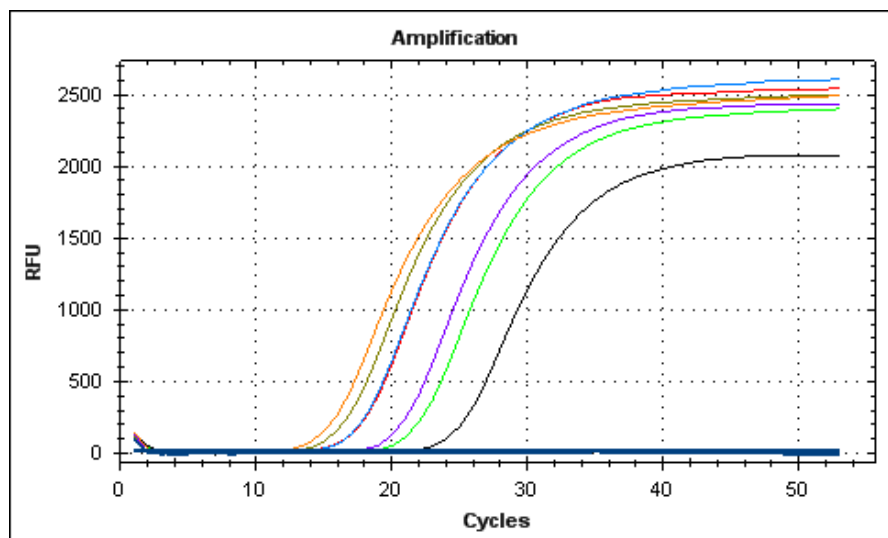


Figura 39 – Resultado do RT-qPCR de um coelho não vacinado positivo para RDHV2. (pulmão (laranja), baço (verde-oliva), rim (turquesa), fígado (vermelho), ventrículo esquerdo (roxo), duodeno (limão) e fezes (preto)).

Os resultados da análise estatística comparativa para identificação de diferenças significativas entre os valores de Cq obtidos em cada coelho, nas diferentes matrizes dos animais do grupo NVAC, são apresentados na Tabela 22. São apresentados os valores de p .

Tabela 22 – Valores de Cq presentes nas diferentes matrizes dos animais não-vacinados (NVAC; n=15).

**ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE Cq DO GRUPO NVAC
OBTIDOS NAS DIFERENTES MATRIZES (p-VALUES calculados pelo *Related-Samples
Wilcoxon Signed Rank Test*)**

MATRIZ	FÍGADO	BAÇO	DUODENO	FEZES	RIM	PULMÃO	VENTRÍCULO ESQUERDO
FÍGADO		0,064	0,191	0,023	0,0211	0,975	0,211
BAÇO			0,281	0,008*	0,125	0,594	0,233
DUODENO				0,027*	0,776	0,307	0,650
FEZES					0,009**	0,009**	0,008**
RIM						0,211	1,000
PULMÃO							0,221
ANÁLISE DESCRITIVA DOS VALORES DE Cq							
Cq mínimo	11,28	12,34	12,45	18,91	12,35	10,57	13,64
Cq máximo	38,01	38,01	33,92	38,01	36,44	38,01	38,01
Cq médio	22,49	22,10	23,24	27,62	23,94	23,54	24,65
σ	9,822	9,60	6,92	6,92	7,14	8,58	7,98

* p value < 0,05. ** p value < 0,01

Na Tabela 23 encontram-se os resultados da análise estatística comparativa para identificação de diferenças significativas nos valores médios de Cq encontrados nas diferentes matrizes, entre os coelhos dos grupos VAC e NVA, sendo apresentado o valor de *p*.

Tabela 23 – Valores de Cq presentes nas diferentes matrizes entre os grupos de coelhos-bravos VAC e NVAC.

COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DE Cq ENTRE OS COELHOS VACINADOS VS NÃO-VACINADOS							
	FÍGADO	BAÇO	DUODENO	FEZES	RIM	PULMÃO	VENTRÍCULO ESQUERDO
<i>p value</i>	0,025*	0,016*	0,001**	0,053	<0,001**	0,077	0,007**
Diferença Cq	-8,79	-8,54	-8,82	-4,55	-9,46	-4,77	-7,98

p value* < 0,05. *p value* < 0,01

Tabela 24 – Comparação da positividade das matrizes entre os grupos de coelhos-bravos VAC e NVAC

PERCENTAGEM DE POSITIVIDADE (P) E NEGATIVIDADE (N) DAS DIFERENTES MATRIZES NOS GRUPOS VAC E NVAC														
	FÍGADO		BAÇO		DUODENO		FEZES		RIM		PULMÃO		VENTRÍCULO ESQUERDO	
GRUPO	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
VAC	24,0	76,0	19,3	81,3	9,3	90,7	33,7	66,3	24,0	76,0	0,0	100,0	9,3	90,7
NVAC	13,3	86,7	20,0	80,0	0,0	100,0	13,3	86,7	0,0	100,0	6,7	93,3	0,0	100,0
<i>p value</i>	0,67		1,00		0,50		0,25		0,06		0,42		0,50	

N – valor de Cq < 38,00; P – valor de Cq > 38,00.

Os resultados da análise estatística comparativa para identificar diferenças significativas na frequência de matrizes positivas entre os grupos VAC e NVAC são apresentados na Tabela 24.

3.3. Resultados duvidosos do RT-qPCR

O grupo de animais cujos resultados foram considerados duvidosos para a presença de RHDV2 (DUV) inclui dez coelhos-bravos (n=10) compreendendo um animal do Lou1, sete animais do grupo QP3 e dois do grupo HI2. Estes animais foram excluídos dos grupos de origem para permitir a análise estatística mais robusta (Tabela 5). Foram considerados duvidosos por apresentarem pelo menos uma matriz com 35,00 < Cq < 38,00 com repetibilidade e consistência no RT-qPCR bem como alterações histopatológicas compatíveis com DHV (Tabela 20).

Tabela 25 – Frequência de valor de Cq < 38,00 das matrizes nos coelhos-bravos duvidosos (DUV).

PERCENTAGEM DE POSITIVIDADE (P) E NEGATIVIDADE (N) DAS DIFERENTES MATRIZES NOS GRUPOS VAC E NVAC														
GRUPO	FÍGADO		BAÇO		DUODENO		FEZES		RIM		PULMÃO		VENTRÍCULO ESQUERDO	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
DUV	80	20	90	10	90	10	70	30	100	0	40	60	20	80

DUV- coelhos com resultado duvidoso; N – valor de Cq < 38,00; P – valor de Cq < 38,00.

Na Tabela 26 apresentam-se os resultados da análise estatística comparativa. São apresentados os *p value* para a comparação entre os valores de Cq encontrados, para cada coelho do grupo DUV, nas diferentes matrizes.

Tabela 26 – Comparação dos valores de Cq obtidos no RT-qPCR das diferentes matrizes dos coelhos-bravos DUV.

ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE Cq DO GRUPO DUV OBTIDOS NAS DIFERENTES MATRIZES (p-VALUES calculados pelo <i>Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test</i>)							
MATRIZ	FÍGADO	BAÇO	DUODENO	FEZES	RIM	PULMÃO	VENTRÍCULO ESQUERDO
FÍGADO		0,285	0,285	0,686	0,180	0,866	0,093
BAÇO			0,655	0,715	0,317	0,176	0,012*
DUODENO				0,109	0,317	0,128	0,028*
FEZES					0,109	0,327	0,059
RIM						0,028*	0,012*
PULMÃO							0,012*
ANÁLISE DESCRITIVA DOS VALORES DE Cq							
Cq mínimo	27,97	31,29	32,87	32,77	38,01	31,04	27,11
Cq máximo	38,01	38,01	38,01	38,01	38,01	38,01	38,01
Cq médio	36,22	37,34	37,50	36,88	38,01	35,99	32,67
σ	3,82	2,13	1,63	2,13	0,00	2,70	3,74

**p value* < 0,05-

4. Resultado de RT-qPCR e lesões histopatológicas em lebres, mesocarnívoros, roedores e pardal-comum

Foram analisadas duas lebres (*Lepus granatensis*) da Herdade do Infantado, uma das quais um feto de termo. Este feto foi encontrado junto de uma lebre fêmea adulta, presumivelmente sua progenitora, cuja cavidade abdominal estava exposta, apenas com a presença do trato digestivo. Não foi detetado RHDV2 nas fezes da lebre adulta. Foi detetado RHDV2 no fígado (Cq 34,68) e no ventrículo esquerdo (Cq 31,27) do feto (Figura 40). Até ao momento, não foi possível confirmar a presença de RHDV2 por sequenciação. O grau de decomposição do feto era avançado, pelo que não foi realizada histopatologia.

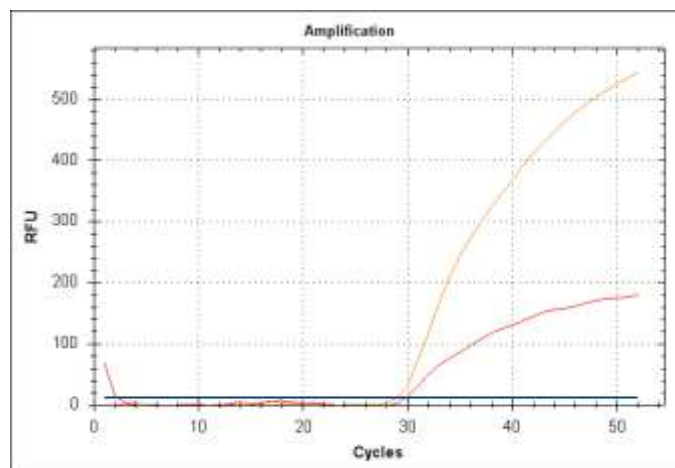


Figura 40 Resultado do RT-qPCR para o RDHV2 para o ventrículo esquerdo (laranja) e fígado (vermelho) de uma lebre

Foi detetado RNA de RHDV2 no pulmão do toirão (*Mustela putorius*) (Cq 28,26, Figura 41). Na análise histopatológica, o fígado revelou congestão capilar e hemossiderose e no pulmão observou-se aumento da espessura dos tabiques interalveolares com infiltração por células mononucleadas.

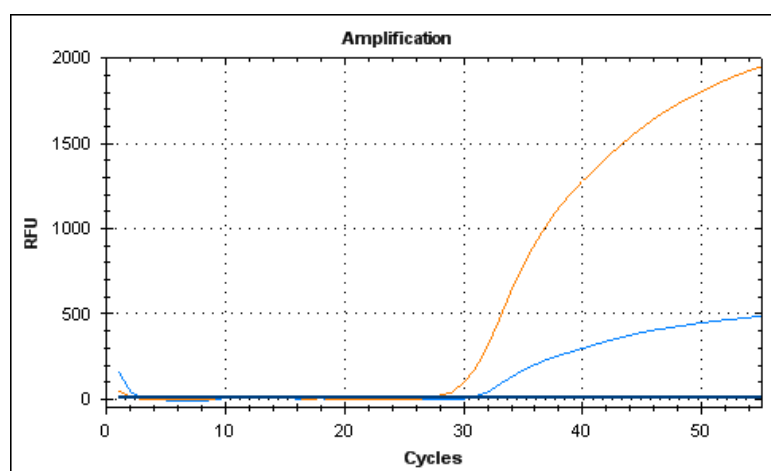


Figura 41 – Resultado do RT-qPCR para o RDHV2 para o pulmão (laranja) e rim (turquesa) de um toirão

Foram ainda analisados, 18 roedores (17 *Apodemus sylvaticus* e 1 *Eliomys quercinus*), um texugo (*Meles meles*) e um sacarrabos (*Herpestes ichneumon*). Não foram encontradas alterações em qualquer um dos órgãos analisados à histopatologia passíveis de serem resultantes de infecção por RHDV2, nem foi detetado RHDV2 por RT-qPCR.

O pardal-comum (*Passer domesticus*) foi capturado, não intencionalmente, por uma das armadilhas de ratos, não sendo inicialmente alvo do estudo. As fezes do pardal amostrado testaram positivamente no RT-qPCR de forma consistente, apesar de apresentarem um valor de Cq relativamente alto (32,51, Figura 42) indicativo de carga viral baixa, o que seria espetável numa espécie não suscetível à infecção.

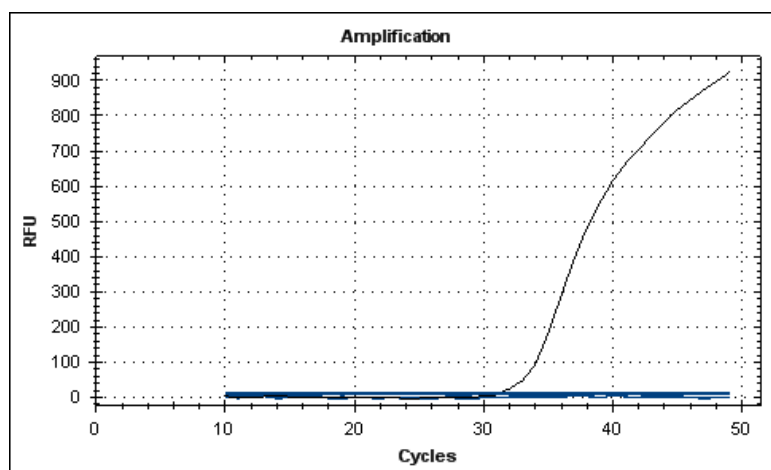


Figura 42– Resultado do RT-qPCR para RHDV2 num pardal-comum, para a matriz fezes.

5. Pesquisa de RHDV2 em insetos e ixodídeos

5.1. Resultados da captura na Quinta dos Penedinhos

Os resultados da captura de insetos voadores realizada na Quinta dos Penedinhos encontram-se descritos na Tabela 27.

Tabela 27 – Classificação taxonómica e número dos insetos capturados na Quinta dos Penedinhos.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA				
ORDEM	SUBORDEM	FAMÍLIA	GÉNERO	N
Lepidoptera Heterocera		-	-	18
Diptera	Nematocera	Chironomidae	-	7
Lepidoptera Rhopalocera		-	-	1
Diptera	Nematocera	Tipulidae	-	14
Coleoptera	Polyphaga	Scarabaeidae	-	5
Diptera	Nematocera	Psychodidae	-	351*
Diptera	Nematocera	Culicidae	<i>Culex</i>	1
Diptera	Nematocera	Culicidae	-	4
Diptera	Brachycera	Phoridae	-	1
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	-	1

*Foram realizados *pools* da família Psychodidae, com cerca de 50 insetos, totalizando 7 *pools*. Sempre que não indicado, o grupo de insetos corresponde a um *pool* analisado. N=número de espécimes capturados.

5.2. Resultados da captura de insetos e ixodídeos na Herdade do Infantado

Os resultados da captura de insetos voadores e ixodídeos realizada na Herdade do Infantado encontram-se descritos na Tabela 28.

Tabela 28 - Classificação taxonómica e número dos insetos e ixodídeos capturados na Herdade do Infantado.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA				
ORDEM	SUBORDEM	FAMÍLIA	GÉNERO/ ESPÉCIE	N
Diptera	Nematocera	Tipulidae	-	16
Coleoptera	Polyphaga	Scarabaeidae	-	925*
Diptera	Nematocera	Psychodidae	-	80*
Diptera	Brachycera	Phoridae	-	7
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	-	104*
Diptera	Polyphaga	Staphylinidae		353*
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	<i>Culicoides spp.</i>	450*
Diptera Infraordem Muscomorpha				36
Lepidoptera	Glossata	Geometridae	<i>Opisthograptis spp.</i>	1
Hymenoptera	Apocrita	Formicidae		67*
Diptera	Brachycera	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	14
Diptera	Brachycera	Anthomyiidae	<i>Anthomyia spp.</i>	29
Hymenoptera	Apocrita	Aulacidae		2
Diptera	Brachycera	Calliphoridae	<i>Calliphora spp.</i>	2
Diptera	Brachycera	Calliphoridae	<i>Lucilia spp.</i>	1
Diptera	Nematocera	Psychodidae	<i>Phlebotomus spp.</i>	2
Diptera	Brachycera	Chloropidae	<i>Thaumatomyia spp.</i>	1
Diptera Subordem Nematocera				1
Diptera	Brachycera	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga spp.</i>	2
Diptera		Ulidiidae		1
Orthoptera				43 (um pool)
Diptera Subordem Nematocera	Nematocera	Simuliidae		1
Dermaptera		Spongiphoridae	<i>Labia minor</i>	5
Diptera	Brachycera	Drosophilidae	<i>D. melanogaster</i>	8
Hymenoptera				1

Subordem Apocrita				
Brachycera Infraordem Asilomorpha	Brachycera	Asilidae		1
Diptera	Brachycera	Syrphidae		1
Diptera		Asteiidae		8
Coleoptera		Apionidae	<i>Apion frumentarium</i>	3
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	5 ♀
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	4 ♀
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	7 ♂
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	3 ♀
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	5 ♀
Acarina		Ixodidae	<i>Dermacentor</i>	6 ♂
Acarina		Ixodidae	<i>Haemaphysalis</i>	1 ♂
Acarina		Ixodidae	<i>R. rhipicephalus</i>	1 ♀
Acarina		Ixodidae	<i>R. rhipicephalus</i>	6 ♂

*Foram realizados *pools* de 10 insetos para a família *Scarabaeidae*, de 50 insetos no caso dos *Culicoides* e de 30 insetos para os restantes grupos taxonómicos. Sempre que não indicado, o grupo de insetos ou ixodídeos das tabelas corresponderam a um *pool* analisado. N- número de espécimes capturados.

5.3. RT-qPCR dos ixodídeos

Não foi detetado RNA de RHDV2 em nenhum dos *pools* de ixodídeos analisados por RT-qPCR, tendo sido obtidos valores de Cq > 38,00 ou ausência de registo de fluorescência.

5.4. RT-qPCR dos insetos

Da mesma forma, não foi detetado, por RT-qPCR, RNA de RHDV2 em nenhum dos *pools* de insetos capturados na Quinta dos Penedinhos, tendo sido obtidos valores de Cq > 38 ou ausência de registo de fluorescência.

No entanto, na Herdade do Infantado, foi detetado RNA de RHDV2 nos *pools* de insetos que constam da Tabela 29. O rastreio inicial consistiu numa pesquisa em 2 *pools* de insetos pertencentes a cada grupo taxonómico considerado suspeito, por estar envolvido na transmissão de outras doenças infecciosas, por ter características de alimentação que pudessem levar ao contacto com este vírus, ou por qualquer outro aspeto considerado pertinente. Para todos os grupos taxonómicos nos quais só foi possível constituir um *pool*, todos os *pools* foram analisados por RT-qPCR para a presença de RHDV2. Quando a pesquisa inicial indicou suspeição sobre um determinado grupo taxonómico, todos os *pools* desse grupo foram analisados. A captura na Herdade do Infantado foi realizada de 9 a 30 de Junho, o que se refletiu,

em comparação com a amostra da Quinta dos Penedinhos, numa maior quantidade e riqueza de grupos taxonómicos.

Tabela 29 – Classificação taxonómica dos insetos capturados na Herdade do Infantado, em cujos *pools* foi detetado RNA de RHDV2.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA dos INSETOS POSITIVOS A RHDV2					
ORDEM	SUBORDEM	FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	GÉNERO	VALORES de Cq
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	Ceratopogoninae	<i>Culicoides</i>	36,80
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	Ceratopogoninae	<i>Culicoides</i> (Anexo IV, Fig. 2)	34,87
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	Forcipomyiinae (Anexo IV, Fig. 3)		33,84
Diptera	Nematocera	Ceratopogonidae	Forcipomyiinae		34,99
Coleoptera	Polyphaga	Staphylinidae			35,75
Coleoptera	Polyphaga	Staphylinidae (Anexo IV, Fig. 4)			35,66
Coleoptera	Polyphaga	Staphylinidae			34,30
Coleoptera	Polyphaga	Staphylinidae			33,11
Diptera	Nematocera	Simuliidae (Anexo IV, Fig. 1)			32,05

6. Correlação entre os resultados da histopatologia e virologia

Embora haja uma tendência geral de proporcionalidade directa, entre a gravidade das lesões observadas e a numeração crescente dos padrões histopatológicos descritos, as particularidades de cada padrão deverão ser acauteladas, já que em alguns órgãos os padrões iniciais não correspondem de forma evidente a quadros mais disruptivos. Tal como já foi anteriormente apresentado de forma separada, aqui mostra-se a relação entre o valor de Cq e o padrão de lesão encontrado no fígado (Figura 43). Constatou-se que no caso dos coelhos não vacinados, foram encontrados valores de Cq tendencialmente menores, e em simultâneo, foi encontrado o padrão lesional considerado mais grave. No caso dos animais vacinados, com valores de Cq tendencialmente maiores, os padrões de lesão encontrados foram mais variáveis, notando-se contudo a menor prevalência do padrão lesional considerado mais grave (padrão 7).

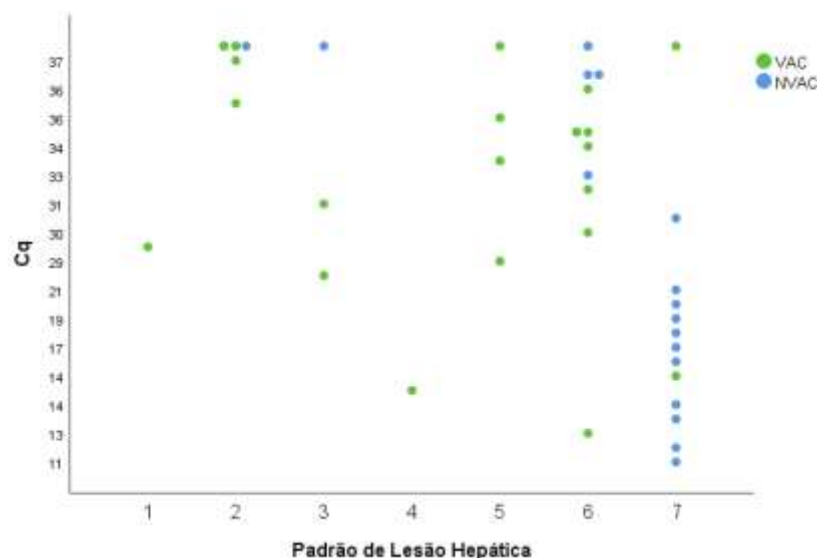


Figura 43 – Associação entre o valor de Cq e o padrão de lesão encontrados no fígado. Verde-animais vacinados; Azul- animais não vacinados

No caso do pulmão, continuam a verificar-se valores de Cq tendencialmente superiores no grupo de coelhos vacinados (Figura 44). Não é possível estabelecer uma relação entre o valor de Cq (e a carga viral) e a gravidade das lesões, de forma tão marcada como o que se verificou no fígado. Contudo, observa-se que os padrões de lesão P#3 e P#4 (correspondendo a pneumonias intersticiais), encontram-se preferencialmente em valores de Cq mais baixos, enquanto os padrões em que a congestão e edema são predominantes se observam tendencialmente em animais com valores de Cq mais altos.

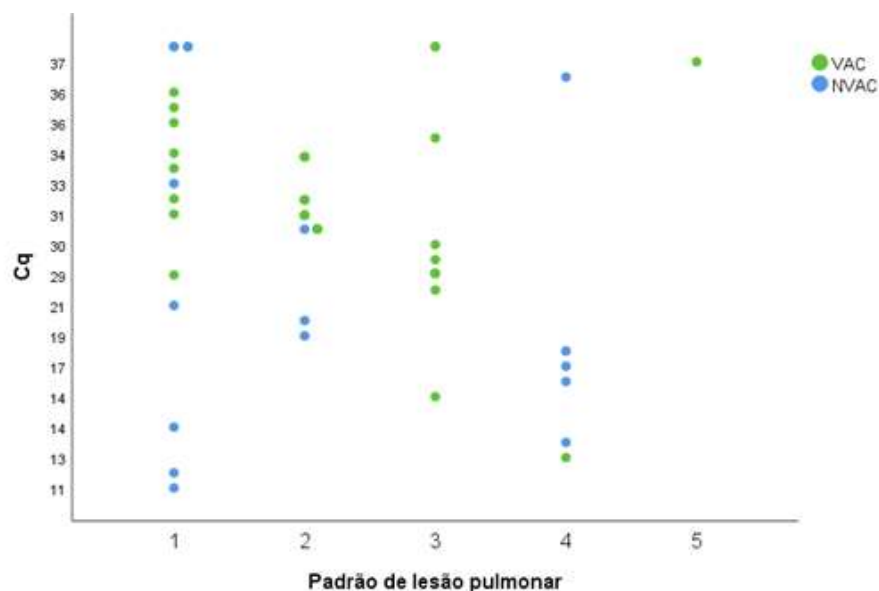


Figura 44 – Associação entre o valor de Cq e o padrão de lesão encontrados no pulmão. Verde-animais vacinados; Azul- animais não vacinados

Capítulo IV – Discussão

1. Características dos surtos de mortalidade de coelhos-bravos por RHDV2 na Quinta dos Penedinhos

Desde janeiro de 2017 até fevereiro de 2018, foram verificados 4 surtos com mortalidade. O primeiro surto (QP1) causou mortalidade durante dois dias, sugerindo tratar-se de forma aguda, e reforçado pelo fato de apenas 3 dos 14 animais afetados apresentarem lesões macroscópicas indicativas de DHV. Estes animais encontravam-se vacinados para RHDV2 (vacinação administrada 15 dias antes), mas ainda não tinham realizado o reforço vacinal. Foram todos positivos para RHDV2 por RT-qPCR, tendo duas (n=2) das amostras sido confirmadas por sequenciação de uma porção do gene *vp60* com 384 nucleótidos de extensão. A comparação com sequencias disponíveis nas bases de dados públicas, por análise *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmou tratar-se de uma estirpe de RHDV2 e revelou grande identidade com uma série de estirpes oriundas de Portugal (Anexo II).

No segundo surto (QP2), a mortalidade de sete animais ocorreu ao longo de 19 dias, o que parece indicar uma forma mais arrastada de doença ou suscetibilidade variável ao vírus ao longo deste tempo, tendo todos os coelhos mortos apresentado à necrópsia, lesões macroscópicas indicativas de DHV. Contudo, não foram encontradas diferenças nos valores de Cq ou nas lesões histopatológicas entre os dois grupos de animais pelo que são apresentados neste trabalho como integrando o mesmo grupo de animais vacinados (VAC). Foram todos positivos a RHDV2 no RT-qPCR, mas os resultados de sequenciação ainda não estão concluídos nesta fase. Apesar de se encontrarem vacinados, estes coelhos, ainda não tinham recebido o reforço vacinal, e não é possível garantir que a vacinação tenha sido bem realizada, nem que as condições da vacina no momento da sua administração eram as ideais. Contudo, dado tratar-se de uma vacina inativada, e o antígeno ter uma resistência de 12 meses, a hipótese da vacina não estar nas boas condições, é pouco provável uma vez que foi sempre mantida refrigerada. A vacina foi aplicada de acordo com a idade, dose e via de administração recomendadas pelo fabricante. A dose e idade de vacinação foram determinadas e padronizadas para o coelho doméstico (cunicultura industrial), sendo que o coelho-bravo à mesma idade, não apresenta o mesmo peso, devendo eventualmente estudar-se a necessidade de ajustar a dose vacinal ao peso e idade do coelho-bravo. O estado imunológico e sanitário dos coelhos no momento da

vacinação não foi assegurado por um médico veterinário, podendo os coelhos encontrar-se num estado de saúde deficitário que justificasse a falta de desenvolvimento de resposta imunitária eficaz. Por outro lado, dada a idade dos animais na altura da vacinação (60 dias) há que considerar a possível existência de anticorpos maternos que interfiram e comprometam o desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz pelo vírus vacinal. Os anticorpos maternos IgG são adquiridos na última fase da gestação por via placentária e no colostro [Lorenzo Fraile, comunicação pessoal, citado por Carvalho et al. (2017)] podendo persistir até aos 12 meses (Cooke, 2002). Na Quinta dos Penedinhos, as coelhas de reprodução são regularmente capturadas e vacinadas pelo que é provável que exista passagem de anticorpos maternos em grande quantidade para as crias. A grande amplitude de cargas virais encontradas entre os animais do mesmo surto sugere que a resposta imunitária dos diferentes animais seja consequência direta de diferentes níveis de imunidade passiva de origem materna, ou indireta, pela diferente imunidade de origem vacinal condicionada pela imunidade materna.

Apesar de ter sido estudada a eficácia da vacinação e a recuperação das populações durante um surto de doença, mas os resultados não são definitivos nem esclarecedores (Cabezas et al., 2006). As populações de coelhos-bravo são caracterizadas por uma prevalência de anticorpos para a mixomatose e DHV que é dependente e inversamente proporcional à idade (Cooke et al., 2000). Na Quinta dos Penedinhos, a vacinação coincide com um período de alteração do habitat e da alimentação podendo estes fatores serem desencadeadores de stress e, portanto, afetar o desenvolvimento da resposta imunitária. O stress que envolve a captura, manuseamento e vacinação, podem levar a um desconforto tal que induz a quebra na condição corporal e consequentemente torna os animais mais suscetíveis à doença (Berteaux et al., 1994). Calvete & Estrada (2004) demonstraram que os procedimentos associados à vacinação podem apresentar um efeito negativo na sobrevivência dos coelhos principalmente se em má condição corporal e juvenis. Este fato foi comprovado na Quinta dos Penedinhos, uma vez que o grupo de coelhos, que apresentava uma idade estimada em 60 dias, apresentava peso reduzido (entre os 150 e 300g), em comparação com o peso para a mesma idade (400-500g) considerado como padrão para os coelhos-bravos da mesma idade referido na bibliografia (Ferreira & Ferreira, 2014). A eficácia da vacinação pode ainda ser afetada pelo padrão espaço-temporal altamente variável do RHDV (Villafuerte et al., 2000), pelo tempo entre a vacinação e o surto e a intensidade do mesmo surto (Calvete, 2006), assim como pelas práticas de manejo do habitat (Ferreira and Ferreira, 2014). Na Quinta dos Penedinhos, é praticada a vacinação para o RHDV e RHDV2 em simultâneo. Contudo, análises serológicas realizadas (Montbrau et al., 2012), permitiram verificar que a vacinação para RHDV não interfere com a resposta serológica ao RHDV2. Gall & Schirmer (2006) verificaram que a vacinação é responsável por cargas virais

mais baixas, mas não é capaz de induzir imunidade esterilizante, variando o grau de replicação viral diretamente com a carga viral com que o animal contacta e inversamente com o nível de proteção humoral desenvolvido. Não existem estudos que descartem a possibilidade destes animais atuarem como portadores e excretadores, bem como definir a tipologia de lesões orgânicas que podem ser causadas por estas replicações virais de baixo grau, nomeadamente após re-infeções. O terceiro surto (QP3) é referido na discussão dos animais duvidosos.

O quarto evento de mortalidade (QP4) refere-se a um animal, que nunca tinha sido capturado e, portanto, não havia sido vacinado. Neste animal, todas as matrizes foram positivas e os valores de Cq baixos (Tabela 20 e Figura 37), muito provavelmente pelo facto de não ter imunidade adquirida por contacto prévio com este vírus (Carvalho et al., 2017).

Nos sub-grupos de coelhos QP1 e QP2, as matrizes foram, em geral, todas positivas para RHDV2. O mesmo não se verificou no subgrupo QP3 (discutido no subcapítulo dos animais duvidosos).

Esta diferença pode dever-se, por um lado à menor idade (1,5 - 2 meses) destes animais (QP1, QP2) em relação aos animais QP3 (3,5 - 4 meses) e, por outro, ao facto de se encontrarem apenas vacinados com uma dose. Contudo, existiram matrizes que embora de modo geral tenham sido positivas ao RHDV2, pontualmente testaram negativamente tal como se resume nas Tabelas 20 e 24. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na prevalência de positividade nas diferentes matrizes entre o grupo dos animais vacinados e dos animais não vacinados (Tabela 24). No futuro, deverá amostrar-se um maior número de animais para obtenção valores mais robustos para efeitos de comparação.

O diagnóstico de RHDV2 utiliza como matrizes principais o fígado, baço e pulmão (OIE, 2015b). Os resultados obtidos nesta investigação, confirmam que o baço e pulmão são as que apresentam menor valor de Cq, correspondendo a maiores cargas virais. No entanto, o duodeno, pulmão e ventrículo esquerdo revelaram-se neste estudo como as matrizes com maior prevalência de resultado positivo (cerca de 90%). Conforme ilustrado na Figura 36, não se verificou amplificação nas amostras de fígado, fezes ou outras, pontualmente em determinados animais. Como se verificou no RT-qPCR, as fezes, rim e fígado, foram as matrizes com maior prevalência de resultado negativo (66-76%). Neste grupo de animais vacinados, o pulmão apresentou um valor de Cq inferior ao fígado ($p<0,05$), baço ($p<0,05$), duodeno ($p<0,05$), rim ($p<0,05$) e ventrículo esquerdo ($p<0,05$). Assim o pulmão assume-se como a matriz de eleição (Cq mais baixos), com um valor de Cq médio de 28,31 e um D.P de 5,92 para animais vacinados.

Não foram encontradas lesões macro e microscópicas diferentes entre os coelhos jovens e os animais adultos tal como se encontra descrito na literatura (Dalton et al., 2012).

2. Os dados da necrópsia, e os exames histopatológicos e virológicos, não revelaram a presença de RHDV2 nos roedores capturados na Quinta dos Penedinhos

Todos os roedores analisados (*Apodemus sylvaticus*, n= 17 e *Eliomys quercinus*, n=1) foram negativos ao RT-qPCR, para todas as matrizes testadas, tendo em conta os mesmos pressupostos utilizados para os coelhos. O fato de não ter sido detetado vírus nestes roedores não exclui a sua importância e o seu papel na disseminação do vírus. A captura foi iniciada no fim do surto QP2 de RHDV2 (27 de abril de 2017), contudo, foi mais eficaz numa zona da Quinta, onde a população de coelhos era constituída essencialmente por animais adultos, com várias vacinações para RHDV2 e onde não ocorreu mortalidade. Por outro lado, o *Apodemus sylvaticus* alimenta-se principalmente de sementes, plantas verdes, frutas e alimentos para animais (The Mammal Society, 2015). Como neste local, o alimento é abundante, tanto em pastagem natural como em ração de coelho industrial, é pouco provável que os roedores se alimentem de fezes de coelhos, onde possivelmente poderiam contactar com vírus.

A coocorrência destas espécies de micromamíferos durante surtos de doença pode levar a que sejam infetados passivamente pela impregnação de partículas virais nas patas que são ingeridas durante o *grooming* (Merchán et al., 2011). Outra fonte de infeção poderá ser a necrofagia do cadáver dos coelhos, especialmente dos que morrem no interior das tocas (Cooke, 1996). A via fecal-oral de infeção, à semelhança dos coelhos (Xu & Chen, 1989), poderá também acontecer no *A. sylvaticus* ou *M. spretus* através da ingestão de fezes de coelhos (Valverde, 1967).

A ração é disponibilizada aos coelhos em comedouros que são acessíveis aos roedores, e onde existem vestígios destes, portanto caso a ração dos coelhos estivesse eventualmente contaminada, pelas fezes dos próprios animais, seria possível estabelecer aqui uma fonte de disseminação. Porém, no caso em concreto dos locais de captura do presente trabalho, a contaminação da ração por fezes dos coelhos não costuma ocorrer, uma vez que os comedouros são desenhados para evitar a conspurcação pelos dejetos sólidos ou urina. Assim, é necessária maior amostragem com captura durante um período de tempo mais alargado para averiguar o real papel destes pequenos mamíferos na DHV. É também necessário avaliar a importância de outras espécies como o murganho (*Mus musculus*) ou a ratazana (*Rattus norvegicus*), por apresentarem um padrão alimentar mais alargado, podendo alimentar-se de cadáveres de animais mortos, como coelhos (Imber et al., 2000), possivelmente infetados com RHDV. Na Quinta dos Penedinhos, os cadáveres dos coelhos são prontamente removidos, não ficando ao dispor destes roedores, pelo que o cenário de necrofagia é menos provável. Houve grande dificuldade na captura dos roedores, tendo sido testadas dois tipos de armadilhas (Figura 12). Sabe-se que tanto o camudongo como a ratazana são mais difíceis de capturar por armadilhas,

devido ao fenómeno de ‘*trap-shyness*’ que pode ser inerente (por reação a um novo objeto, descrito por Chitty & Southern (1954)) ou por aprendizagem (Hogarth, 1929).

3. A ausência de deteção de RHDV2 por RT-qPCR nos insetos capturados na Quinta dos Penedinhos pode ter resultado de uma amostragem tendenciosa

A amostragem de insetos foi reduzida, o que pode ser explicado pela altura do ano em que as colheitas foram efetuadas (9 a 27 de Abril), verificando-se no momento condições climáticas desfavoráveis para o efeito, existindo classicamente nesta altura do ano (nomeadamente a chuva e temperaturas baixas) menor número de espécies de insetos voadores e menor abundância relativa dos mesmos, que se refletiu na preponderância da família *Psychodidae* que representou cerca de 87% da nossa amostragem (Jonason et al., 2014). As espécies de *Psychodidae* estão descritas como detendo um padrão alimentar eclético (Jonason et al., 2014) embora mostrando maior atração pelas aves e cães (Jonason et al., 2014). Assim, como a armadilha foi colocada perto de um parque de perdizes (*Alectoris rufa*), é provável que estas tenham sido a principal fonte alimentar destes espécimes. Nos outros grupos taxonómicos, a amostragem foi muito reduzida, pelo que os resultados negativos podem resultar do número de insetos incluídos nestes *pools*. É importante que em próximos estudos deve ser conseguida uma amostragem mais representativa, utilizando outro tipo de armadilhas, e em maior número, por forma a efetuar as capturas em outras alturas do ano.

4. Características dos surtos de mortalidade de coelhos-bravos por RHDV2 na Herdade do Infantado

Desde janeiro de 2017 a fevereiro de 2018, foram detetados surtos de mortalidade, tendo sido diagnosticados animais positivos a RHDV2 por métodos moleculares e análise histopatológica, em março e julho. Os animais vitimizados em dezembro foram considerados duvidosos. A ocorrência do maior pico de mortalidade em março (n=7) pode dever-se à existência, nesta altura, de um número elevado de animais jovens potencialmente suscetíveis. O facto de apenas terem sido recolhidos 7 animais, pode ser justificado por muitos dos animais poderem ter morrido dentro das tocas ou em locais em que a vegetação não permitiu encontrá-los. Contudo, verificou-se que, apesar de ter sido diagnosticado RHDV2 nesta herdade, a população de coelho-bravo manteve os seus números estáveis não se estimando que a mortalidade tenha sido muito elevada. A explicação para esta mortalidade tão reduzida, poderá dever-se às medidas sanitárias praticadas na Herdade: desinfeção regular das tocas, implementação de comedouros e alimentadores protegidos de contaminação e controlo de roedores e insetos e ainda à boa condição corporal dos animais.

Na Austrália, Elsworth, Kovaliski & Cooke (2012) identificaram populações com resistência moderada ao RHDV. Uma grande proporção de coelhos tinha resistência a uma dose de infecção baixa, contudo, nenhum se mostrou resistente quando a dose infectante era elevada. Outra das explicações, poderá estar relacionada com a eventual presença e circulação de calicivírus não patogénicos que conferem proteção parcial para a doença hemorrágica viral (Strive et al., 2010). A incidência diminuta no verão e outono pode ser explicada pela temperatura ambiental mais elevada que pode influenciar negativamente a sobrevivência do vírus no ambiente.

Apesar da população de coelho-bravo se manter estável na Herdade do Infantado, os surtos de DHV continuam a ser registados, podendo ocorrer uma co-evolução entre o vírus e a população de coelho-bravo.

5. Os dados da necrópsia, e os exames histopatológicos e virológicos, não indiciaram a circulação de RHDV2 em roedores capturados na Herdade do Infantado

No caso da Herdade do Infantado, a captura de roedores foi ainda mais difícil, possivelmente por se tratar de um ambiente totalmente selvagem, onde a densidade destas espécies tende a ser inferior à de um local mais urbano e atrativo. Na Herdade do Infantado, a disponibilidade alimentar é muito grande e variada o que torna menos provável a captura de roedores por armadilhas de isco. O facto de terem sido capturados num espaço temporal afastado de um surto de RHDV2 pode ser uma das justificações para não ter sido encontrado vírus nestes animais. No futuro, à pesquisa de RHDV2, deverá ser alida a pesquisa de anticorpos específicos, para avaliar a existência de contacto com o vírus e a seroconversão por parte dos roedores.

6. Detecção de RNA RHDV2 num Pardal- comum (*Passer domesticus*), pode sugerir o papel de outras aves, para além das aves de presa, na disseminação do vírus

Não obstante o valor de Cq (32,51, Figura 39), considerado alto (mas positivo) e da fluorescência atingida reduzida (900 RFU) quando comparados com os valores normalizados para o coelho-bravo, o facto desta análise se restringir a um único espécimen, limita as conclusões possíveis com base neste resultado apenas. Deve referir-se contudo, que estes valores de Cq e fluorescência seriam considerados também positivos num coelho-bravo.

Naturalmente, sendo mero vetor mecânico de transmissão, a confirmar-se no futuro, é compreensível que este pardal, não contenha cargas virais em quantidades semelhantes às detectadas em coelho, onde o vírus replica ativamente. Este resultado, torna assim pertinente averiguar melhor a importância desta e de outras espécies de pequenas aves na disseminação do vírus (OIE Terrestrial Manual, 2016), uma vez que partilham o habitat com o coelho. Os registos fotográficos revelam que na Herdade do Infantado, aves de pequeno porte se alimentam

nos comedouros e bebedouros dos coelhos, contactando de perto com estes. Ao terem uma dieta bastante variada, incluindo sementes e grãos que capturam no solo, podem facilmente contactar com o vírus que se encontre presente no solo.

7. Detecção de RHDV2 por RT-qPCR em insetos capturados na da Herdade do Infantado

Foi detetado RHDV2 em *pools* de insetos que incluíam o género *Culicoides* e subfamília Forcipomyiinae, ambos pertencentes à família Ceratopogonidae, e membros das famílias Staphylinidae e género *Simulium*. Todos estes géneros foram descritos em Portugal ou na Europa. Ninio et al., (2011) descreveram o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) como fonte alimentar para 20% dos culicídeos estudados, que incluíam oito espécies diferentes, podendo este género de insetos infetar-se com RHDV2 a partir de coelhos que apresentem virémia. Os culicídeos vivem em média 20 dias na fase adulta, podendo ultrapassar os 90 dias (González de Heredia & Lafuente, 2011; Ninio et al., 2011). Devido a isto, é pouco provável que constituam reservatórios de vírus durante longos períodos de tempo. Contudo, a sua importância na disseminação do vírus entre colónias durante os surtos deverá ser melhor estudada. A subfamília Forcipomyiinae e o género *Simulium* têm um aparelho bucal sugador, podendo ter um papel importante na disseminação do vírus a partir de coelhos virémicos. Alguns géneros da família Staphylinidae, que já foram encontrados em cadáveres de coelhos (Klimaszewski, 1984), vivem 40 a 72 dias como adultos (Read, 1962), sendo pouco provável que mantenham o vírus entre surtos. Contudo, esta família, poderá ter um papel de disseminação do vírus entre locais distantes (por exemplo, entre tocas de diferentes colónias), onde a via fecal-oral de infeção parece ser pouco provável. O género *Leptacinus* apresenta características de bionomia: presença em estrume, compostos e habitats semelhantes que tornam provável o contacto com fezes e cadáveres de coelhos infetados. Os resultados obtidos não permitem tirar conclusões acerca da importância destes insetos na transmissão da DHV, mas abrem portas para o estudo mais aprofundado do papel dos mesmos, devendo, no futuro, ser um dos enfoques principais da pesquisa do vírus em condições de campo. O valor de Cq e, consequentemente, o valor de carga viral não permite inferir acerca da possibilidade de o vírus existir em quantidade suficiente para infetar um coelho, pois a técnica de RT-qPCR utilizada não está normalizada para este fim. O facto dos insetos serem positivos ao PCR, não significa que sejam capazes de transmitir o vírus a coelhos suscetíveis, como foi demonstrado por McColl et al. (2002). Apenas 1 em 13 das amostras dos insetos positivas ao PCR, continham vírus suficiente para causar a doença quando inoculado em coelhos suscetíveis (McColl et al., 2002). É ainda de admitir a hipótese de durante a colheita, identificação dos insetos e processamento possa ter ocorrido degradação do RNA,

levando a um resultado inferior ao real. Contudo, tendo em conta que a colheita dos insetos terminou a 30 de junho de 2017, e tendo vindo a verificar-se a ocorrência de mortalidade cerca de 2 dias depois num animal que testou positivo para RHDV2, é provável que a ocorrência de positividade entre estes dois grupos esteja relacionada, sendo, no entanto, necessário comparar as sequências nucleotídicas dos dois vírus para se poder propor, ou excluir, uma origem comum. Tendo em conta a degradação do vírus, altamente provável nestes insetos, será possivelmente difícil obter uma sequência com dimensão suficiente para permitir a comparação de identidade das duas sequências.

8. Detecção de RHDV2 em mesocarnívoro (Toirão)

Os resultados que foram obtidos no toirão são a primeira evidência da circulação de RHDV2 nesta espécie. Apesar dos valores de Cq elevados no RT-qPCR, e de o resultado ainda não estar confirmado por sequenciação, é uma espécie que partilha o habitat com o coelho, sendo especializada na captura de coelho-bravo.

A heterogeneidade das populações de vírus de RNA resulta numa situação contínua de “*trials and error*” e consequente seleção natural dos mutantes emergentes que podem ter vantagens evolutivas, por exemplo, ultrapassando a imunidade de hospedeiro e a barreira inter-espécie (Gould, 2012).

9. Significado e interpretação dos resultados duvidosos ou negativos obtidos em alguns coelhos-bravos recolhidos, suspeitos de morte por DHV

Dois dos coelhos do grupo QP3 da Quinta dos Penedinhos foram considerados negativos (ausência de fluorescência ou Cq > 38 em todas as matrizes) bem como o animal do surto HI3, pelas mesmas razões. O reduzido número de coelhos negativos, deveu-se ao enviesamento da amostra que apenas considerou animais altamente suspeitos, pelas características de epidemiologia ou pela presença de sinais indicativos de doença hemorrágica viral no momento da amostragem (*e.g.* epistaxis). Ainda deste grupo (QP3), o resultado para sete animais foi considerado duvidoso uma vez que num destes animais apenas uma matriz foi positiva, noutra três matrizes foram positivas e em cinco animais apenas duas matrizes foram positivas. Igualmente, o animal do surto Lou1 apresentou apenas duas matrizes positivas e os dois animais do surto HI2, apresentaram apenas duas ou três matrizes positivas. Esta dificuldade em detetar vírus, pode dever-se ao programa de vacinação a que estes animais tinham sido sujeitos (RHDV e RHDV2 com reforço) no caso da Quinta dos Penedinhos (QP3), que está associado a valores de Cq mais altos (Carvalho et al., 2017). Carvalho et al. (2017) mostraram que a carga viral em

animais vacinados era muito inferior à dos animais não vacinados (média de valor de Cq de $32,01 \pm 6,18$). Por outro lado, os animais correspondentes ao Lou1 e HI2 não haviam sido vacinados, podendo a dificuldade nestes casos, ser justificada por uma progressão mais lenta da doença. Não foi também possível, nestes animais, amplificar um segmento de RNA para sequenciação, provavelmente devido à reduzida qualidade do RNA viral nos tecidos que, ao encontrar-se muito fragmentado, dificultaria ainda a ligação dos primers e a síntese do amplicon. A sensibilidade do método utilizado aproxima-se dos 100% e a sua especificidade foi testada contra um painel de agentes patogénicos distintos. É por isso improvável que o sinal tardio de fluorescência deste grupo considerado duvidoso, possa ser o resultante da amplificação de material genético de outro organismo (Duarte et al., 2015). As amostras foram extraídas automaticamente e em separado de outros materiais positivos a RHDV2 (processados no âmbito do projecto +Coelho em curso desde setembro de 2017), tornando a ocorrência de contaminação entre amostras pouco provável. Os RT-qPCR foram repetidos várias vezes para estes materiais, tendo sido obtida repetibilidade e consistência nos valores de Cq. A possibilidade do material genético detetado ser originário da vacinação é também improvável (Gall & Schirmer, 2006; Carvalho et al., 2017). No entanto, a alta sensibilidade do método molecular leva a que o RNA viral da vacina inativada possa originar falsos positivos ao RT-qPCR, se aquele ainda estiver presente nos tecidos. Diversas hipóteses podem explicar a presença do RNA vacinal nos tecidos, nomeadamente a injeção intravenosa não intencional, o aumento de permeabilidade sanguínea no local da injeção ou a associação do vírus inativado a eritrócitos (Eschbaumer et al., 2010; Steinrigl et al., 2010; De Leeuw et al., 2015). Para esclarecer esta hipótese, será necessário sequenciar e comparar o RNA vacinal e o RNA da matriz. Nestes casos, encontramos dificuldade na amplificação de regiões mais extensas do genoma viral para sequenciação, provavelmente fruto da carga baixa viral, especialmente se o material já não se encontrasse nas melhores condições.

Nestes animais com diagnóstico molecular duvidoso, existiam lesões histopatológicas em todos os órgãos, absolutamente incompatíveis com a vida.

No grupo de animais QP3, sujeitos a vacinação (primo e reforço), e que não apresentavam autólise ou putrefação significativas que pudessem afetar os resultados histopatológicos, é difícil encontrar uma explicação para a origem das lesões multiorgânicas observadas que não a infeção por RHDV2. A análise do microbioma e viroma destes animais através de técnicas de *Whole Genome Sequencing* ajudaria a descartar a presença de outros agentes patogénicos ainda desconhecidos nesta espécie. Os nossos resultados parecem sugerir que, nestes animais, a imunidade humoral possa ter impedido a progressão da doença e a multiplicação viral em larga escala, contudo não impedindo o desenvolvimento progressivo de lesões, cuja extensão acabou

por conduzir o animal à morte. Este padrão de carga viral baixa/lesão extensa, é ainda caracterizado pelo facto de a mortalidade destes animais ocorrer de forma muito espaçada. Assim, estes casos de forma aparentemente crónica de doença necessitam de ser melhor investigados, nomeadamente em ambiente laboratorial controlado.

Não é possível afirmar com absoluta certeza que as lesões orgânicas observadas se deveram a DHV. Contudo, não foram encontradas alterações à necrópsia ou histopatologia compatíveis com qualquer outra patologia conhecida. Os animais do surto QP3 encontravam-se vacinados (incluindo com reforço) para a Mixomatose, e sendo esta vacina muito eficaz, a morte por infeção com o vírus mixoma é altamente improvável (European Medicines Agency [EMA], 2011). Outras doenças de origem bacteriana ou parasitária, não foram investigadas. As etiologias que poderiam explicar o grau elevado de necrose hepática observada, seriam a lesão hepática induzida por ingestão de tóxicos, tais como fungos na ração, metais pesados na água ou de plantas tóxicas. Contudo, tratando-se, na Quinta dos Penedinhos, de uma produção de coelho-bravo com alimentação e água rigorosamente controlados, todas estas hipóteses são descartadas. A verdadeira influência da vacinação, e da vacina usada em concreto nesta exploração, e a possibilidade desta ser detetada e diferenciada pelo RT-qPCR, deverão ser mais aprofundadas. A possibilidade de um animal infetado sobreviver inicialmente à doença (Shien et al., 2000) e de o vírus e antigénios virais, presentes no fígado, pulmão, rim e fezes poderem já não ser detectados uma semana após a inoculação experimental, foi anteriormente reportada (Shien et al., 2000). De acordo com a informação disponível na literatura, a única matriz que se manteve positiva 47 dias após inoculação foi a biliar (Shien et al., 2000). Por esta razão, a biliar deverá também ser amostrada e analisada em próximos estudos. Poderá também conjecturar-se que o vírus se terá replicado e lesionado os órgãos sem levar o animal à morte numa primeira instância, assumindo a doença evolução crónica e as lesões uma evolução auto-perpetuante, tendo vindo os animais a sucumbir mais tarde, quando o vírus já se encontrava eliminado em parte ou na totalidade. Embora a amostragem seja muito reduzida para tratamento estatístico, neste grupo (DUV) de 10 animais o ventrículo esquerdo foi positivo em 80% dos casos, aparecendo o pulmão em segundo lugar (60%), tendo o fígado sido positivo em apenas 20% dos casos estudados. O coração contém 9.1% do volume total sanguíneo no coelho enquanto o fígado detém cerca de 29,6% (Dickinson and Walker, 1970). O coração é o segundo órgão com maior volume sanguíneo, podendo assim ser rapidamente sujeito à infeção por grandes quantidades de vírus durante a fase de virémia.

Nos animais positivos vacinados (grupo VAC), 7 dos animais apresentaram valor de $C_q > 38$ no fígado e/ou baço, e neste grupo de animais o ventrículo esquerdo foi positivo em 6 dos animais com um C_q médio de 33,75. A verdadeira justificação para a aparente carga viral mais

alta no músculo cardíaco deverá ser esclarecida, no que toca à patogenia do vírus, à relação com vacinação parcial, e formas de evolução da doença mais arrastadas (subaguda e crónica) que poderão eventualmente justificar a persistência e deteção do vírus nesta matriz. Neste grupo, o ventrículo esquerdo apresentou um valor de Cq médio de 32,67 (\pm 2.32) inferior ao baço ($p= 0,012$), duodeno ($p= 0,028$), rim ($p= 0,012$) e pulmão ($p= 0,012$). Mais uma vez se ressalva que o reduzido número de animais não permite sobrevalorizar este resultado, mas suscita interesse e requiere futuros esclarecimentos.

Também nestes animais, à semelhança do que aconteceu nos animais duvidosos da QP, a matriz que revelou valores de Cq mais baixos foi o ventrículo esquerdo. É difícil estabelecer um padrão em relação a este facto porque o número de animais é muito reduzido. Porém, neste caso, os animais nunca foram vacinados e as hipóteses de intoxicação são também remotas porque a alimentação e água são controladas. Os coelhos têm acesso a prado natural, e naturalmente a plantas tóxicas, contudo não existindo escassez alimentar a ingestão de plantas tóxicas pelos coelhos é pouco provável. Trata-se de uma herdade fechada onde é impossível entrarem animais de outras origens que pudessem eventualmente estar vacinados, portanto a presença de vírus vacinal é impossível. Neste grupo, as lesões histopatológicas, particularmente a necrose hepática extensa, lesões renais e cardíacas são também incompatíveis com a vida. O resultado deste conjunto de animais, torna imperativo avaliar de que forma a doença subaguda ou crónica pode dificultar o diagnóstico molecular, uma vez que existem lesões orgânicas extensas associadas a quantidades reduzidas de RNA viral.

O surto QP3 correspondeu a uma mortalidade arrastada ao longo de três meses. Este grupo de animais vacinados, e com reforço (QP3, $n=9$) tinha idades estimadas entre os 3,5 e 4 meses. Até ao momento ainda não foi possível sequenciar o vírus a partir destes animais, por se encontrar em pequena quantidade, muito provavelmente fruto da resposta imunitária. Os baixos níveis detetados nesses coelhos provavelmente resultam de replicação viral limitada pela vacinação. Existe a possibilidade do vírus detetado pelo RT-qPCR ser de origem vacinal, contudo as lesões histopatológicas encontradas nestes animais, nomeadamente a necrose difusa grave generalizada dos hepatócitos com dissociação das trabéculas acrescentam força à hipótese de que os coelhos terão desenvolvido doença hemorrágica viral.

Liu et al. (2015) obteve valores de Cq perto de 30 em coelhos vacinados para RHDV, tendo os coelhos desenvolvido imunidade por vacinação e/ou aquisição de anticorpos maternos. Apesar de vacinados, as cargas virais foram altas e surpreendentes, sugerindo que em muitos coelhos imunizados, o RHDV continua a circular na forma de doença sub-aguda ou crónica. A infeção por RHDV em coelhos imunizados foi também detetada em coelhos-bravos (Capucci et al.,

1998). A ocorrência de doença em coelhos imunizados pode dever-se a variação na carga viral infectante ou ao baixo nível de resposta imunitária desenvolvida (Liu et al., 2015).

A dificuldade de um diagnóstico molecular conclusivo em alguns materiais, é geralmente ultrapassada pelo pedido de mais material, em situação de suspeita de foco na indústria, e pelo acesso a vários exemplares em situação de foco na vida selvagem.

10. As diferenças encontradas nos padrões entre os animais vacinados e não vacinados, sugerem uma progressão diferente da doença

Os quadros anatomopatológicos identificados nas populações de coelho-bravo em estudo foram, de um modo geral, coincidentes com o que está descrito na literatura (Hering, 2003). A progressão da doença numa população de coelhos industrial vacinada, já foi anteriormente estudada por Carvalho et al. (2017b). A exceção será o miocárdio no qual se identificou frequentemente a presença de serosidade acumulada entre as fibras, tanto em vacinados como em não vacinados.

Entre os coelhos vacinados e não vacinados identificaram-se quadros lesionais sistematicamente mais graves nos não vacinados, o que sugere que a doença poderá ter progressão mais rápida nestes.

Nos animais não vacinados, foi mais frequente o padrão de lesão hepática F#7 (necrose difusa grave generalizada dos hepatócitos com dissociação das trabéculas, com menos de 50% dos hepatócitos a exibir núcleo, estando este picnótico) do que no grupo dos vacinados ($p=0,001$). Este facto poderá ser fruto das altas cargas virais no fígado nos coelhos não vacinados (Cq em média, 8,79 ciclos abaixo da matriz homóloga nos animais vacinados). Esta relação pode ser visualizada na figura 41.

No pulmão, o padrão P#4 (espessamento dos tabiques interalveolares, por vezes com infiltração de células mononucleadas, edema alveolar e/ou congestão - Pneumonia intersticial difusa) foi mais frequente nos animais não vacinados ($p=0,028$). Nos animais vacinados foi mais frequente o padrão P#3 (congestão muito marcada dos capilares alveolares, com zonas restritas de espessamento dos tabiques interalveolares com atelectasia moderada a severa – pneumonia intersticial focal) ($p=0,027$). Assim, tal como no fígado, os níveis de gravidade lesional são mais acentuados no pulmão dos coelhos não vacinados, podendo corresponder à progressão mais rápida da pneumonia, o que poderá estar refletido na maior carga viral (valor de Cq, em média, 4,77 ciclos abaixo em relação aos vacinados) encontrado nestes animais ($p=0,077$). Esta relação pode ser visualizada na figura 42.

O padrão de lesão renal R#3 (glomerulite trombosante praticamente generalizada com discreta degenerescência granular das células tubulares) foi mais frequente nos coelhos não vacinados

($p=0,003$); o padrão de lesão renal R#2 (acidofila discreta das células tubulares), por seu lado, foi mais frequente nos coelhos vacinados ($p=0,041$). Esta diferença pode ser reflexo, mais uma vez, das maiores cargas virais (Cq em média 9,46 ciclos abaixo) encontradas neste órgão nos animais não vacinados ($p<0,001$).

Também no baço, foi observado que o padrão B#5 (necrose da polpa vermelha e necrose discreta das células linfoides dos folículos da polpa branca) foi mais frequente nos animais não vacinados. Neste órgão, os valores de Cq foram, em média, 8,54 ciclos abaixo nos não vacinados ($p=0,016$) relativamente aos vacinados.

No timo observou-se maior frequência de lesões de necrose (padrão T#3) nos coelhos não vacinados em relação aos vacinados ($p=0,008$), tendo sido observado o inverso ($p<0,001$) nos coelhos vacinados, ou seja, foi mais frequente o padrão T#1 (congestão e/ou hemorragia), menos grave que o anterior.

Capítulo V – Conclusão

A doença hemorrágica viral pelas suas características endêmicas, distribuição em todos os continentes, imprevisibilidade, características clínicas, histopatológicas e virológicas diversas, passagem da barreira inter-espécie, entre outras, torna-se uma doença cujo estudo e avaliação permanece imperiosa e urgente. As características do vírus, principalmente a impossibilidade de o cultivarmos *in vitro*, tornam a avaliação epidemiológica no campo crucial, e a aproximação do laboratório ao terreno absolutamente essencial, o que tantas vezes não é feito. A rápida evolução do vírus, fruto da sua elevada taxa de variação genética, antigénica e patogénica, dificultam o seu estudo, mas, simultaneamente, tornam este desafio apaixonante.

Através deste estudo, foi possível verificar que a doença é capaz de afetar animais em cenários ecológicos completamente distintos, e ter ao mesmo tempo um comportamento imprevisível, quando avaliado do ponto de vista clínico, laboratorial e epidemiológico.

Foi possível concluir que a doença teve um grande impacto numa população vacinada, e sanitariamente controlada, tendo sido encontrados entre os animais vacinados; 21/30 positivos (70%), 7/30 duvidosos (23%) e 2/30 negativos (7%), tendo sido a doença virtualmente superior à de um local quase selvagem, sem recurso a vacinação, embora nestes dois contextos o rigor da monitorização seja efetivamente distinto. Esta observação não significa, contudo, que a vacinação não seja vantajosa. Ela é aliás, altamente recomendada. Há, no entanto, um conjunto vasto de fatores que interferem com o seu resultado, alguns eventualmente críticos, ainda pouco estudados nesta espécie.

As características de difusão entre micromamíferos, mesocarnívoros e insetos, tornam a doença hemorrágica viral um modelo de eleição para o estudo da interação vírus-hospedeiro num ecossistema natural. As suas características de resistência extrema no ambiente permitem a interação de muitos objetos animados e inanimados na sua difusão a grandes distâncias.

O estudo da doença hemorrágica viral no coelho-bravo resume-se, na maior parte da bibliografia, ao estudo do vírus, muitas vezes não sendo possível a análise em larga escala das lesões histopatológicas associadas, frequentemente fruto do avançado estado de autólise e putrefação em que os animais são encontrados.

Aqui, são estabelecidos padrões de lesão histopatológicos para os vários órgãos em cerca de 46 animais positivos para a presença de RNA viral por RT-qPCR. O estabelecimento de padrões histopatológicos de referência tornou-se obrigatório para permitir a comparação dos diferentes

grupos de animais, já que não é possível agrupar e comparar as lesões descritas pelos diversos autores devido à diversidade de terminologia utilizada, e alguma subjetividade das descrições. Por outro lado, não se encontrou uma clara associação direta entre o aumento de carga viral detetada no órgão e a gravidade das lesões histopatológicas observadas. Isto poderá ser resultante do grau de suscetibilidade variável dos animais à infeção, que não foi propósito deste estudo esclarecer. A vacinação, a forma de progressão da doença, a concomitância de outras infeções, o estado de nutrição do animal no momento da infeção, a sua idade, entre outros fatores, pode levar a que os animais desenvolvam lesões completamente diferentes quando sujeitos à mesma dose infecciosa. O carácter sistémico de disseminação do vírus, verificado neste estudo pela deteção de RNA num elevado número de matrizes, poderá justificar a diferente distribuição do vírus no decurso do seu mecanismo fisiopatológico, podendo as cargas virais ser altamente variáveis em órgãos que apresentam o mesmo padrão de lesão histopatológica, pelo facto de já ter ocorrido “*clearance*” do vírus.

Não obstante disto verificou-se, contudo, uma tendência para a presença de lesões histopatológicas mais graves no fígado e pulmão nos animais não-vacinados, onde foram encontrados, simultaneamente, cargas virais mais altas.

Foi encontrada uma elevada percentagem de positivos a RT-qPCR entre os animais vacinados; 21/30 positivos (70%), 7/30 duvidosos (23%) e 2/30 negativos (7%);

Os nossos resultados parecem sugerir que, nestes animais, a imunidade humoral possa ter impedido a progressão da doença e a multiplicação viral em larga escala, contudo não impedindo o desenvolvimento progressivo de lesões, cuja extensão acabou por conduzir o animal à morte. Este padrão de carga viral baixa/lesão extensa, é ainda caracterizado pelo facto de a mortalidade destes animais ocorrer de forma muito espaçada. Assim, estes casos de forma aparentemente crónica de doença necessitam de ser melhor investigados, nomeadamente em ambiente laboratorial controlado.

Neste grupo de animais, verificou-se consistentemente positividade mais evidente na matriz “ventrículo esquerdo”, que na maioria dos animais apresentou o menor valor de Cq, correspondendo a uma maior carga viral. Este fato, nunca antes reportado na bibliografia, abre novas portas para a investigação da patogenia e dinâmica de distribuição do vírus e do seu diferente tropismo no decurso da infeção e sugere que este órgão deve ser também utilizado no diagnóstico.

Nos animais vacinados, o duodeno, ventrículo esquerdo e pulmão apresentaram a maior frequência de positividade, pelo que consideramos que são boas matrizes para diagnóstico molecular em animais vacinados.

Por outro lado, nos animais não-vacinados o duodeno, ventrículo esquerdo e rim apresentaram a maior frequência de positividade, sendo da mesma forma indicadas como boas matrizes para diagnóstico molecular em animais não vacinados.

Tanto quanto é sabido, este estudo incorpora também a primeira descrição de detecção de RHDV2 em insetos capturados em condições naturais. Os dados obtidos sugerem a necessidade de aprofundar a investigação do papel de quatro grupos taxonómicos (género *Culicoides*, subfamília *Forcipomyiinae*, e famílias *Staphylinidae* e *Simuliidae*) na dinâmica de manutenção e transmissão do vírus.

Para estudar a questão da importância da forma subaguda da DHV, bem como a importância dos calicivírus não patogénicos, será aplicado o método de amostragem biológica em vida que foi desenvolvido no âmbito desta dissertação (<http://www.inia.v.pt/menu-de-topo/divulgacao/edicoes-proprias/videos-institucionais/captura-e-sedacao-de-coelho-bravo>). A partir destas amostras de sangue, será efetuada serologia que permitirá inferir a presença de anticorpos que confirmam imunidade para RHDV2 e eventualmente a presença de calicivírus por RT-PCR no duodeno destes animais.

A eficácia da vacinação em coelhos-bravos deve também ser investigada uma vez que neste estudo verificámos que um grande número de animais que morreram de DHV se encontravam vacinados, provavelmente pela ocorrência por vários fatores confluentes, entre os quais a interferência com a imunidade materna. Contudo, a vacinação mostrou ter ação na progressão da doença, resultando em cargas virais mais baixas e também na redução da gravidade das lesões causada em alguns órgãos, nomeadamente no fígado, pulmão, timo e rim.

Referências Bibliográficas

- Abade dos Santos, F., 2017. A doença hemorrágica viral do coelho-bravo. *Veterinária Atual* Maio.
- Abade dos Santos, F.A., Carvalho, C., Nuno, O., Correia, J.J., Henriques, M., Peleteiro, M.C., Fevereiro, M., Duarte, M.D., 2017. Detection of rabbit Haemorrhagic disease virus 2 during the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) eradication from the Berlengas archipelago, Portugal. *BMC Vet. Res.* 13, 336. doi:10.1186/s12917-017-1257-3
- Abrantes, J., Esteves, P., 2010. Not-So-Novel Michigan Rabbit Calicivirus. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1331–1332. doi:10.3201/1608.100711
- Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Melo, P., Correia, J.J., Ramada, M., Alves, P.C., Parra, F., Esteves, P.J., 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1900–1902. doi:10.3201/eid1911.130908
- Abrantes, J., Lopes, A.M., Esteves, P.J., 2012a. Complete Genomic Sequences of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus G1 Strains Isolated in the European Rabbit Original Range. *J. Virol.* 86, 9–10. doi:10.1128/JVI.02683-12
- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., Esteves, P.J., 2012b. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet. Res.* 43, 12. doi:10.1186/1297-9716-43-12
- Aguado, A., 2003. Factores que afectan a la distribución y abundancia del conejo en Andalucía. Universidad Complutense De Madrid: 1-9.
- Alves, P.C., Moreno, S., 1996. Estudo da reprodução do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) em Portugal. *Rev Florest.* 9, 149–166.
- Angulo, E., 2004. El Conejo, el monte mediterraneo en Andalucía. *Cons. Medio Ambient.* Junta Andalucía, Sevilla.
- Angulo, E., Cooke, B., 2002. First synthesize new viruses then regulate their release? The case of the wild rabbit. *Mol. Ecol.* 11, 2703–2709. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01635.x
- Anónimos, 1989. Doença hemorrágica a vírus do Coelho em Portugal. *Rev Port Ciênc Vet* 84, 57–58.
- Anonymous, 2000. Rabbit calicivirus infection confirmed in Iowa rabbitry. *Am Vet Med Assoc* 216, 1537.
- Aragão, H.B., 1927. Myxoma of rabbits. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 20, 225–247.
- Argüello-Villares, J.L., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev. Sci. Tech.* 10 459–480.
- Argüello, J., Llanos, A., Pérez, L., 1988. Enfermedad hemorrágica del conejo en España. *Med Vet* 5, 645–650.
- Arnaud, J.M., 1987. Os concheiros mesolíticos dos vales do Tejo e Sado: semelhanças e diferenças. *Arqueologia* 15, 53–64.
- Asgari, S., Hardy, J.R.E., Cooke, B.D., 1999. Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: Alterations after its release. *Arch. Virol.* 144, 135–145. doi:10.1007/s007050050490
- Asgari, S., Hardy, J.R.E., Sinclair, R.G., Cooke, B.D., 1998. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera: Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res.* 54, 123–132. doi:10.1016/S0168-1702(98)00017-3

- Baily, J.L., Dagleish, M.P., Graham, M., Maley, M., Rocchi, M.S., 2014. RHDV variant 2 presence detected in Scotland. *Vet. Rec.* 174, 411.1-411. doi:10.1136/vr.g2781
- Bárcena, J., Guerra, B., Angulo, I., González, J., Valcárcel, F., Mata, C.P., Castón, J.R., Blanco, E., Alejo, A., 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet. Res.* 46, 1–6. doi:10.1186/s13567-015-0245-5
- Bárcena, J., Verdaguer, N., Roca, R., Morales, M., Angulo, I., Risco, C., Carrascosa, J.L., Torres, J.M., Castón, J.R., 2004. The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid. *Virology* 322, 118–134. doi:10.1016/j.virol.2004.01.021
- Barrientos, J.A. (Ed.), 2004. Curso Practico de Entomología. Manuals de la Universitat Autònoma de Barcelona. 41. Entomologia. Asociación Española de Entomología, CIBIO-Centro Iberoamericano de Biodiversidad & Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bartlett, M.S., 1957. Measles periodicity and community size. *J. Roy. Stat. Soc. A* 120, 48–70. doi:10.2307/2342553
- Bell, D.J., Webb, N.J., 1991. Effects of climate on reproduction in the European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Zool.* 224, 639–648.
- Berteaux, D., Duhamel, R., Bergeron, J., 1994. Can radio collars affect dominance relationships in *Microtus*? *Can. J. Zool.* 72, 785–789. doi:10.1139/z94-106
- Biadi, F., Le Gall, A., 1993. Le lapin de garenne. Vie, gestion et chasse d'un gibier authentique. Éditions Hatier. 160.
- Boga, J.A., Marín, M.S., Casais, R., Prieto, M., Parra, F., 1992. In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish field isolate AST/89 of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Virus Res.* 26, 33–40. doi:10.1016/0168-1702(92)90144-X
- Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilia, M., Meyers, G., Thiel, H.J., Rossi, C., 1994. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J. Virol.* 68, 6487–95.
- Branco, M., Ferrand, N., Monnerot, M., 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity (Edinb.)* 85, 307–317. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00756.x
- BRC, 2017. New Variant Rabbit Haemorrhagic Disease (RHDV2) [WWW Document]. Brithish Rabbit Counc. URL [http://www.thebrc.org/RHD Update \(V2\) 03 08 2017.pdf](http://www.thebrc.org/RHD%20Update%20(V2)%2003%2008%202017.pdf) (accessed 3.15.18).
- Buddle, B.M., de Lisle, G.W., McColl, K., Collins, B.J., Morrissy, C., Westbury, H.A., 1997. Response of the north island brown kiwi, apteryx australis mantelli and the lesser short-tailed bat, mystacina tuberculata to a measured dose of rabbit haemorrhagic disease viru. *N. Z. Vet. J.* 45, 109–113. doi:10.1080/00480169.1997.36004
- Cabezas, S., Calvete, C., Moreno, S., 2006. Vaccination success and body condition in the European wild rabbit: applications for conservation strategies. *J. Wildl. Manage.* 70, 1125–1131. doi:10.2193/0022-541
- Cabral, M.J., 2005. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa. 659p, in: Almeida, J., Almeida, P.R., Delliger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queirós, A.I., Rogado, L., Santos-Reis, M. (Eds.), .

- Callou, C., 1995. Modifications de l'aire de répartition du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) en France et en Espagne, du Pléistocène à l'époque actuelle. État de la question.
- Calvete, C., 2006. Modeling the effect of population dynamics on the impact of rabbit hemorrhagic disease. *Conserv. Biol.* 20, 1232–1241. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00371.x
- Calvete, C., Angulo, E., Estrada, R., 2005. Conservation of European wild rabbit populations when hunting is age and sex selective. *Biol. Conserv.* 121, 623–634. doi:10.1016/j.biocon.2004.06.013
- Calvete, C., Estrada, R., 2004. Short-term survival and dispersal of translocated European wild rabbits. Improving the release protocol. *Biol. Conserv.* 120, 507–516. doi:10.1016/j.biocon.2004.03.023
- Camarda, A., Pugliese, N., Cavadini, P., Circella, E., Capucci, L., Caroli, A., Legretto, M., Mallia, E., Lavazza, A., 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res. Vet. Sci.* 97, 642–645. doi:10.1016/j.rvsc.2014.10.008
- Cancellotti, F., Renzi, M., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev Sci Tech* 10, 409–422.
- Capucci, L., Cavadini, P., Schiavitto, M., Lombardi, G., Lavazza, A., 2017. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Vet. Rec.* 180, 426.2–426. doi:10.1136/vr.104132
- Capucci, L., Fallacara, F., Grazioli, S., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., Brocchi, E., 1998. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: The appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.* 58, 115–126. doi:10.1016/S0168-1702(98)00106-3
- Capucci, L., Frigoli, G., Ronshold, L., Lavazza, A., Brocchi, E., Rossi, C., 1995. Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies Lorenzo. *Virus Res.* 37, 221–238.
- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., Rossi, C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* 70, 8614–8623.
- Capucci, L., Scicluna, M., Lavazza, A., 1991. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10, 347–370.
- Carrasco, L., Rodriguez, F., de las Mulas, J.M., Wohlsein, P., Fernandez, A., 1991. Immunohistological Diagnosis of Rabbit Haemorrhagic Disease in Experimentally Infected Rabbits in Spain. *J. Vet. Med. Ser. B* 38, 552–555. doi:10.1111/j.1439-0450.1991.tb00910.x
- Carvalho, C.L., 2017. The role of wild leporids as reservoirs of infectious agents. PhD Thesis. Universidade de Évora.
- Carvalho, C.L., Duarte, E.L., Monteiro, M., Botelho, A., Albuquerque, T., Fevereiro, M., Henriques, A.M., Barros, S.S., Duarte, M.D., 2017a. Challenges in the rabbit haemorrhagic disease 2 (RHDV2) molecular diagnosis of vaccinated rabbits. *Vet. Microbiol.* 198, 43–50. doi:10.1016/j.vetmic.2016.12.006
- Carvalho, C.L., Leclerc Duarte, E., Monteiro, J.M., Afonso, C., Pacheco, J., Carvalho, P., Mendonça, P., Botelho, A., Albuquerque, T., Themudo, P., Fevereiro, M., Henriques, A.M., Santos Barros, S., Dias Duarte, M., 2017b. Progression of rabbit haemorrhagic

- disease virus 2 upon vaccination in an industrial rabbitry: A laboratorial approach. *World Rabbit Sci.* 25, 73–85. doi:10.4995/wrs.2017.5708
- Carvalho, Silva, S., Gouveia, P., Costa, M., Duarte, E.L., Henriques, A.M., Barros, S.S., Luís, T., Ramos, F., Fagulha, T., Fevereiro, M., Duarte, M.D., 2017. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016–2017). *Virus Genes* 1–5. doi:10.1007/s11262-017-1483-6
- Chamberlain, R.W., Sudia, W.D., 1961. Mechanism of transmission of viruses by mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 6, 371–390. doi:10.1146/annurev.en.06.010161.002103
- Chasey, D., Lucas, M., Westcott, D., Williams, M., 1992. European brown hare syndrome in the U.K.; a calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits. *Arch. Virol.* 124, 363–370.
- Chen, K., 1986. Rabbit plague 3, 53–55.
- Chen, K.Y., Zeng, D.N., Ning, L., Yin, L.Y., 1987. Changes in blood leucocytes and histology of lymphoid organs in acute phase of experimentally infected rabbit viral haemorrhagic disease. *Chinese J. Verekwy Sci. Technol.* (in Chinese) 5, 38–40.
- Chen, L., Liu, G., Ni, Z., Yu, B., Yun, T., Song, Y., Hua, J., Li, S., Chen, J., 2009. Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60. *J. Gen. Virol.* 90, 2952–2955. doi:10.1099/vir.0.015081-0
- Chitty, D., Southern, H.N., 1954. *Control of Rats and Mice*. Oxford Univ. Press. London 3 vols.
- Cooke, B., 2002. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech* 21, 347–358.
- Cooke, B., Fenner, F., 2003. Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. *Wildl. Res.* 29, 689–706. doi:10.1071/WR02010
- Cooke, B.D., 1996. Field epidemiology of rabbit calicivirus disease in Australia. *Eur. Soc. Vet. Virol. Symp. caliciviruses* September, 15–17.
- Cooke, B.D., Robinson, A.J., Merchant, J.C., Nardin, A., Capucci, M.L., 2000. Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol. Infect* 124, 563–576. doi:10.1017/S0950268899003994
- Cunha Gonçalves, G., 2015. *Gestão de populações de Coelho-bravo : um caso de estudo - a Herdade da Espadaneira Agradecimentos*. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguerza, M.A., Rosell, J.M., Casais, R., Álvarez, Á.L., Parra, F., 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 2009–2012. doi:10.3201/eid1812.120341
- De Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R.N., Ttsetsarkin, K., Higgs, S., Gould, E.A., 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: A sign of things to come? *Virol. J.* 5, 1–4. doi:10.1186/1743-422X-5-33
- De Leeuw, I., Garigliany, M., Bertels, G., Willems, T., Desmecht, D., De Clercq, K., 2015. Bluetongue virus RNA detection by real-time RT-PCR in post-vaccination samples from cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 157–162. doi:10.1111/tbed.12100
- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the western Mediterranean Basin hotspot. *Conserv. Biol.* 22, 1106–1117. doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00993.x
- Delibes-Mateos, M., Ferreira, C., Rouco, C., Villafuerte, R., Barrio, I.C., 2014.

- Conservationists, hunters and farmers: The European rabbit *Oryctolagus cuniculus* management conflict in the Iberian Peninsula. *Mamm. Rev.* 44, 190–203. doi:10.1111/mam.12022
- Delibes-Mateos, M., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2009. European rabbit population trends and associated factors: A review of the situation in the Iberian Peninsula. *Mamm. Rev.* 39, 124–140. doi:10.1111/j.1365-2907.2009.00140.x
- Delibes-Mateos, M., Redpath, S.M., Angulo, E., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2007. Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biol. Conserv.* 137, 149–156. doi:10.1016/j.biocon.2007.01.024
- Delibes, M., Hiraldo, F., 1981. The rabbit as a prey in the Iberian mediterranean ecosystem, in: Myers, K., C.D., M. (Eds.), *Proceedings of the World Lagomorph Conference (1979)*. University of Guelph, Ontario, pp. 654–663.
- Delibes, M., Rodríguez, A., Ferreras, P., 2000. Action Plan for the conservation of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Europe. *Counc. Eur. Publ. Nat. Environ.* Strasbourg, Fr. 111.
- Dellafiore, C.M., Rouco, C., Muñoz Vallés, S., Gallego Fernández, J.B., 2014. Seasonal habitat use by the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in a coastal dune system in SW Spain. *Anim. Biodivers. Conserv.* 37.2, 233–242.
- Dickinson, C.J., Walker, R.H., 1970. Longitudinal distribution of blood in the rabbit in relation to the heart, with observations on the contribution of different organs. *Circ. Res.* 27, 851–861. doi:10.1161/01.RES.27.5.851
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martín-Hernández, A.M., Sáiz, J.C., Escarmís, C., 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 521–527. doi:10.3201/eid0404.980402
- Duarte, M., Carvalho, C., Bernardo, S., Barros, S.V., Benevides, S., Flor, L., Monteiro, M., Marques, I., Henriques, M., Barros, S.C., Fagulha, T., Ramos, F., Lu??s, T., Fevereiro, M., 2015. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. *Infect. Genet. Evol.* 35, 163–171. doi:10.1016/j.meegid.2015.08.005
- Duarte, M.D., Carvalho, C.L., Barros, S.C., Henriques, A.M., Ramos, F., Fagulha, T., Lu??s, T., Duarte, E.L., Fevereiro, M., 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods* 219, 90–95. doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.017
- Duarte, M.D., Henriques, A.M., Barros, S., Luís, T., Fagulha, T., Ramos, F., Fevereiro, M., 2014. New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic disease viruses in Portugal: Retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008. *Infect. Genet. Evol.* 27, 149–155. doi:10.1016/j.meegid.2014.07.017
- Duffy, M.R., Chen, T.-H.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. doi:10.1056/NEJMoa0805715
- Elsworth, P., Cooke, B.D., Kovaliski, J., Sinclair, R., Holmes, E.C., Strive, T., 2014. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Virology* 464–465, 415–423. doi:10.1016/j.virol.2014.06.037

- Elsworth, P.G., Kovaliski, J., D., C.B., 2012. Rabbit haemorrhagic disease: are Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) evolving resistance to infection with Czech CAPM 351 RHDV? *Epidemiol. Infect.* 140, 1972–1981. doi:10.1017/S0950268811002743
- EMA, 2011. CVMP assessment report Nobivac Myxo-RHD (EMA/V/C/2004) 44, 1–18.
- Eschbaumer, M., Wäckerlin, R., Rudolf, M., Keller, M., König, P., Zemke, J., Hoffmann, B., Beer, M., 2010. Infectious blood or culture-grown virus: A comparison of bluetongue virus challenge models. *Vet. Microbiol.* 146, 150–154. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.004
- Esteves, P.J., Abrantes, J., Carneiro, M., Müller, A., Thompson, G., van der Loo, W., 2008. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res.* 137, 253–256. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.025
- Farnós, O., Rodríguez, D., Valdés, O., Chiong, M., Parra, F., Toledo, J.R., Fernández, E., Leonart, R., Suárez, M., 2007. Molecular and antigenic characterization of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Cuba indicates a distinct antigenic subtype. *Arch. Virol.* 152, 1215–1221. doi:10.1007/s00705-006-0926-5
- Fenner, F., Ratcliffe, F.N., 1965. *Myxomatosis*. Cambridge Univ. Press. London, UK.
- Ferrand, N., 2008a. Inferring the Evolutionary History of the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from Molecular Markers, in: Alves, P., Ferrand, N., Hackländer, K. (Eds.), *Lagomorph Biology- Evolution, Ecology and Conservation*. pp. 47–63.
- Ferrand, N., 2008b. Inferring the evolutionary history of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from molecular marker, in: Alves, P., Ferrand, N., Hackländer, K. (Eds.), *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology and Conservation*. Springer, Berlin, Germany, pp. 47–63.
- Ferrand, N., Branco, M., 2007. The evolutionary history of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): major patterns of population differentiation and geographic expansion inferred from protein. *Phylogeography South. Eur. Refug.* 207–235.
- Ferreira, A., Ferreira, A.J., 2014. Post-weaning growth of endemic iberian wild rabbit subspecies, *oryctolagus cuniculus algeris*, KEPT in a semi-extensive enclosure: Implications for management and conservation. *World Rabbit Sci.* 22, 129–136. doi:10.4995/wrs.2014.1673
- Ferreira, C., 2012. European rabbit research in the Iberian Peninsula: State of the art and future perspectives. *Eur. J. Wildl. Res.* 58, 885–895. doi:10.1007/s10344-012-0664-9
- Ferreira, C., Alves, P., 2002. A importância ecológica do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*). *Rev. da VII Feira Caça e Pesca do Algarve. Fed. Caçadores do Algarve*.
- Ferreira, C., Alves, P.C., 2009. Influence of habitat management on the abundance and diet of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algeris*) populations in mediterranean ecosystems. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 487–496. doi:10.1007/s10344-009-0257-4
- Ferreira, C.M.A. de C., Delibes-Mateos, M., 2010. Wild Rabbit Management in the Iberian Peninsula: State of the Art and Future Perspectives for Iberian Lynx Conservation. *Wildl. Biol. Pract.* 6, 48–66. doi:10.2461/wbp.lynx.4
- Fonseca, I., Abade dos Santos, F.A., Ramilo, D., Gomes, L., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., 2017. Atlas de Parasitologia Veterinária [WWW Document]. URL www.atlasparasitologia.fmv.ulisboa.pt (accessed 12.15.18).
- Forrester, N.L., Boag, B., Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Gould, E.A., 2003. Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* 84,

- Fouchet, D., Le Pendu, J., Guitton, J.S., Guiserix, M., Marchandeau, S., Pontier, D., 2009. Evolution of microparasites in spatially and genetically structured host populations: The example of RHDV infecting rabbits. *J. Theor. Biol.* 257, 212–227. doi:10.1016/j.jtbi.2008.11.021
- Fouchet, D., Marchandeau, S., Bahi-Jaber, N., Pontier, D., 2007. The role of maternal antibodies in the emergence of severe disease as a result of fragmentation. *J. Roy. Soc. Interface* 4, 479–489. doi:10.1098/rsif.2006.0189
- Frölich, K., Klima, F., Dedek, J., 1998. Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany. *J. Wildl. Dis.* 34, 436–42. doi:10.7589/0090-3558-34.3.436
- Gall, A., Hoffmann, B., Teifke, J.P., Lange, B., Schirrmeier, H., 2007. Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 120, 17–32. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.006
- Gall, a, Schirrmeier, H., 2006. Persistence of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus Genome in Vaccinated Rabbits after Experimental Infection 362, 358–362. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00986.x
- Gálvez-Bravo, L., 2017. Conejo – *Oryctolagus cuniculus* [WWW Document]. *Encicl. Virtual los Vertebr. Españoles*. Salvador. A., Barja, I. (Eds.). Mus. Nac. Ciencias Nat. Madrid. URL <http://www.vertebradosibericos.org/>
- García-Lastra, R., San-Miguel, B., Crespo, I., Jorquera, F., Alvarez, M., González-Gallego, J., Tunon, M.J., 2010. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet. Res.* 41. doi:10.1051/vetres/2009050
- Gehrmann, B. (Bezirksinstitut fuer V.S. (Germany)), Kretzschmar, C., 1991. Experimental investigations on Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) - transmission by flies. *Berliner und Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift* (Germany, F.R.).
- Gibb, J.A., 1990. The European Rabbit, in: Chapman, J.A., J.E., F. (Eds.), *Rabbits, Hares and Pikas: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Switzerland, pp. 116–120.
- Gibb, J.A., Ward, G.D., Ward, C.P., 1969. An experiment in the control of a sparse population of wild rabbits (*Oryctolagus c. cuniculus* L.) in New Zealand. *J. Sci. Technol.* 12, 509–534.
- Gibb, J.A., Williams, J.M., 1990. European rabbit. King, C.M. (Editor), *Handb. New Zeal. Mamm.* Oxford Uni, 138–160.
- Gonçalves, H., Alves, P., Rocha, A., 2002. Seasonal variation in the reproductive activity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) in a Mediterranean ecosystem. *Wildl. Res.* 165–173.
- González de Heredia, M., Lafuente, A., 2011. *El género Culicoides en el País Vasco*, 1st Editio. ed. Eusko Juarlaritza.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F., Roberts, L., 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep.* 6, 968–972. doi:10.1038/sj.embor.7400510
- Gould, A.R., Kattenbelt, J. a, Lenghaus, C., Morrissy, C., Chamberlain, T., Collins, B.J., Westbury, H. a, 1997. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease

- virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.* 47, 7–17.
- Gould, E.A., 2012. First case of rabbit haemorrhagic disease in Canada: Contaminated flying insect, vs. long-term infection hypothesis. *Mol. Ecol.* 21, 1042–1047. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05462.x
- Greenberg, B., 1973. Flies and disease, in: Voll II. Biology and Disease Transmission.
- Gregg, D., House, C., Meyer, R., Berninger, M., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* 10, 435–451.
- Guittre, C., Baginski, I., Le Gall, G., Prave, M., Trepo, C., Cova, L., 1995. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 58, 128–132. doi:10.1016/0034-5288(95)90065-9
- Hall, R.N., Mahar, J.E., Haboury, S., Stevens, V., Holmes, E.C., Strive, T., 2015. Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2276–2278. doi:10.3201/eid2112.151210
- Hall, R.N., Peacock, D.E., Kovaliski, J., Mahar, J.E., Mourant, R., Piper, M., Strive, T., 2017. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Vet. Rec.* 180, 121. doi:10.1136/vr.104034
- Henning, J., 2003. Factors influencing the epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus in New Zealand. Massey University.
- Henning, J., Meers, J., Davies, P.R., Morris, R.S., 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol. Infect.* 133, 719–30. doi:10.1017/S0950268805003766
- Henzell, R.P., Cunningham, R.B., Neave, H.M., 2002. Factors affecting the survival of Australian wild rabbits exposed to rabbit haemorrhagic disease. *Wildl. Res.* 29, 523–542. doi:10.1111/j.1749-4877.2009.00155.x
- Hogarth, A.M., 1929. The Rat: a World Menace, in: Bale, J., Sons, Danielsso (Eds.), . London.
- Hu, Z., Tian, X., Zhai, Y., Xu, W., Zheng, D., Sun, F., 2010. Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein Cell* 1, 48–58. doi:10.1007/s13238-010-0007-0
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. doi:https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5
- ICNF, 2005. Carta de Caçador - Manual para Exame.
- Imber, M., Harrison, M., Harrison, J., 2000. Interactions between petrels, rats and rabbits on Whale Island, and effects of rat and rabbit eradication. *N. Z. J. Ecol.* 24, 153–160. doi:10.2307/24054669
- JA, C., Flux, J., 1990. Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland. Switzerland.
- Jahnke, M., Holmes, E.C., Kerr, P.J., Wright, J.D., Strive, T., 2010. Evolution and phylogeography of the nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia. *J. Virol.* 84, 12397–12404. doi:10.1128/JVI.00777-10
- John, E.F., Sharples, C.M., Bell, D.J., 1999. Habitat correlates of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) distribution after the spread of RVHD in Cadiz Province, Spain. *J. Zool.* 249, 83–96. doi:10.1017/S0952836999009085

- Jonason, D., Franze, M., Thomas, R., 2014. Surveying Moths Using Light Traps: Effects of Weather and Time of Year. *PLoS ONE* 9(3) e92453 101, 1435–1439. doi:10.1371/journal.pone.0092453
- Kerr, P.J., Kitchen, A., Holmes, E.C., 2009. Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 83, 12129–12138. doi:10.1128/jvi.01523-09
- Kinnear, M., Linde, C.C., 2010. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 91, 174–181. doi:10.1099/vir.0.014076-0
- Kinney, R.M., Tsuchiya, K.R., Sneider, J.M., Trent, D.W., 1992. Genetic evidence that epizootic Venezuelan equine encephalitis (VEE) viruses may have evolved from enzootic VEE subtype I-D virus. *Virology* 191, 569–580. doi:10.1016/0042-6822(92)90232-E
- Klimaszewski, J., 1984. A Revision of the Genus *Aleochara* Gravenhorst of America North of Mexico (Coleoptera: Staphylinidae, Aleocharinae). *Mem. Entomol. Soc. Canada* 116, 3–211. doi:10.4039/entm116129fv
- Kovacs, F.S., Gondar, E., Medveczky, I., 1986. SEM studies of the mouthparts of *Musca autumnalis*, *M. domestica* and *M. osiris*. *Abstr. 1st Int Cong Dipterol* 131.
- Kovaliski, J., Sinclair, R., Mutze, G., Peacock, D., Strive, T., Abrantes, J., Esteves, P.J., Holmes, E.C., 2014. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in australia: When one became many. *Mol. Ecol.* 23, 408–420. doi:10.1111/mec.12596
- La Fuente, F.R., 1993. *Cadernos de campo, A Lebre e o Coelho*, Lisboa.
- Laurent, S., Vautherot, J.F., Madelaine, M.F., Le Gall, G., Rasschaert, D., 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J. Virol.* 68, 6794–6798.
- Lavazza, A., Cavadini, P., Barbieri, I., Tizzani, P., Pinheiro, A., Abrantes, J., Esteves, P.J., Grilli, G., Gioia, E., Zanoni, M., Meneguz, P.G., Guitton, J.S., Marchandeu, S., Chiari, M., Capucci, L., 2015a. Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. *Vet. Res.* 46, 1–10. doi:10.1186/s13567-015-0149-4
- Lavazza, A., Scicluna, M.T., Capucci, L., 1996. Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *Zentralbl. Vet. B* 43, 401–410. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00332.x
- Lavazza, A., Tittarelli, C., Cerioli, M., 2015b. The use of convalescent sera in immune-electron microscopy to detect non-suspected/new viral agents. *Viruses* 7, 2683–2703. doi:10.3390/v7052683
- Lavazza A, Capucci, L., 2012. Rabbit haemorrhagic disease, in: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France: Biological Standards Commission, pp. 941–955.
- Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeu, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., Cavadini, P., Martinelli, N., Lombardi, G., Guérin, J.L., Lemaitre, E., Decors, A., Boucher, S., Le Normand, B., Capucci, L., 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 44, 1–13. doi:10.1186/1297-9716-44-81
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guerin, J.-L., Marchandeu, S., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 168, 137–138. doi:10.1136/vr.d697

- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M.P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., Roobrouck, A., Botti, G., Lavazza, A., Marchandeau, S., 2011. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410, 395–402. doi:10.1016/j.virol.2010.12.001
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., De Boissésou, C., Portejoie, Y., Rasschaert, D., 2003. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch. Virol.* 148, 65–81. doi:10.1007/s00705-002-0908-1
- Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J.-S., Le Gall-Reculé, G., Lopes, A.M., Marchandeau, S., Alda, F., Almeida, T., Célio, A.P., Bárcena, J., Burmakina, G., Blanco, E., Calvete, C., Cavadini, P., Cooke, B., Dalton, K., Delibes Mateos, M., Deptula, W., Eden, J.S., Wang, F., Ferreira, C.C., Ferreira, P., Foronda, P., Gonçalves, D., Gavier-Widén, D., Hall, R., Hukowska-Szematowicz, B., Kerr, P., Kovaliski, J., Lavazza, A., Mahar, J., Malogolovkin, A., Marques, R.M., Marques, S., Martin-Alonso, A., Monterroso, P., Moreno, S., Mutze, G., Neimanis, A., Niedzwiedzka-Rystwej, P., Peacock, D., Parra, F., Rocchi, M., Rouco, C., Ruvoën-Clouet, N., Silva, E., Silvério, D., Strive, T., Thompson, G., Tokarz-Deptula, B., Esteves, P., 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 98, 1658—1666. doi:10.1099/jgv.0.000840
- Leighton, F.A., Artois, M., Capucci, L., Gavier-Widén, D., Morisse, J.P., 1995. Antibody response to rabbit viral haemorrhagic disease virus in red foxes (*Vulpes vulpes*) consuming livers of infected rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Wildl. Dis.* 31, 541–544.
- Leisner, V., 1983. As diferentes fases do Neolítico em Portugal. *Arqueol.* 7 7–15.
- Lenghaus, C., Westbury, H.A., Collins, B.J., Ratnamohan, N., Morrissy, C.J., 1994. Overview of the RHD project in Australia.
- Lentacker, A., 1986. Preliminary results of the fauna of Cabeço de Amoreira and Cabeço de Arruda (Muge, Portugal). *Trab. Antropol. e Etnol.* 26 9–26.
- Leuthold, M.M., Dalton, K.P., Hansman, G.S., 2015. Structural Analysis of a Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Binding to Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 89, 2378–2387. doi:10.1128/JVI.02832-14
- Liu, G., Ni, Z., Yun, T., Yu, B., Chen, L., Zhao, W., Hua, J., Chen, J., 2008. A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity. *J. Gen. Virol.* 89, 3080–3085. doi:10.1099/vir.0.2008/003525-0
- Liu, J., Kerr, P.J., Wright, J.D., Strive, T., 2012. Serological assays to discriminate rabbit haemorrhagic disease virus from Australian non-pathogenic rabbit calicivirus. *Vet. Microbiol.* 157, 345–354. doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.018
- Liu, S., Xue, H., Pu, B., Qian, N., 1984. A new viral disease in rabbit. *Anim Husb Vet Med* 16, 253–255.
- Liu, W., Dang, R., Wang, X., 2015. Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits. *Virol. Sin.* 30, 228–230. doi:10.1007/s12250-015-3560-0
- Lloyd-Smith, J.O., Cross, P.C., Briggs, C.J., Daugherty, M., Getz, W.M., Latto, J., Sanchez, M.S., Smith, A.B., Swei, A., 2005. Should we expect population thresholds for wildlife disease? *Trends Ecol. Evol.* 20, 511–519. doi:10.1016/j.tree.2005.07.004
- Löliger, H., Eskens, U., 1991. Incidence, epizootiology, and control of viral hemorrhagic

- disease of rabbits and the European brown hare syndrome virus in Germany. *Rev Sci Tech* 10, 423–34.
- Lopes, A.M., 2016. Insights into the interactions : Lagovirus in leporids. FCUP.
- Lopes, A.M., Correia, J., Abrantes, J., Melo, P., Ramada, M., Magalhães, M.J., Alves, P.C., Esteves, P.J., 2014a. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 7, 27–36. doi:10.3390/v7010027
- Lopes, A.M., Dalton, K.P., Magalhães, M.J., Parra, F., Esteves, P.J., Holmes, E.C., Abrantes, J., 2015. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J. Gen. Virol.* 96, 1309–1319. doi:10.1099/vir.0.000070
- Lopes, A.M., Marques, S., Silva, E., Magalhães, M.J., Pinheiro, A., Alves, P.C., Le Pendu, J., Esteves, P.J., Thompson, G., Abrantes, J., 2014b. Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): Earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. *Vet. Res.* 45, 1–7. doi:10.1186/s13567-014-0094-7
- Lopez-Martinez, N., 2008. The Lagomorph fóssil record and origin of the European rabbit, in: Alves PC, Ferrand N, Hackländer K (Eds). *Lagomorph Biology- Evolution, Ecology and Conservation*. pp. 27–46.
- Lopez-Martinez, N., 1989. Revision sistematica y biostratigrafica de los lagomorphos (Mammalia) del neogeno y cuaternario de España.
- Luque, D., Gonzalez, J.M., Gomez-Blanco, J., Marabini, R., Chichon, J., Mena, I., Angulo, I., Carrascosa, J.L., Verdaguer, N., Trus, B.L., Barcena, J., Caston, J.R., 2012. Epitope Insertion at the N-Terminal Molecular Switch of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus T=3 Capsid Protein Leads to Larger T=4 Capsids. *J. Virol.* 86, 6470–6480. doi:10.1128/JVI.07050-11
- Macdonald, D.W., Barrett, P., 2002. *Mammals of Europe*, Princeton. ed.
- Macdonald, D.W., Barrett, P., 1993. *Mammals of Europe*, New Jersey. ed.
- Machín, Á., Martín Alonso, J.M., Dalton, K.P., Parra, F., 2009. Functional differences between precursor and mature forms of the RNA-dependent RNA polymerase from rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 90, 2114–2118. doi:10.1099/vir.0.011296-0
- Machín, A., Martín Alonso, J.M., Parra, F., 2001. Identification of the Amino Acid Residue Involved in Rabbit Hemorrhagic Disease Virus VPg Uridylylation. *J. Biol. Chem.* 276, 27787–27792. doi:10.1074/jbc.M100707200
- Marcato, P., Benazzi, C., Vecchi, G., Galeotti, M., Della Salda, L., Sarli, G., Lucidi, P., 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 10, 371–392.
- Marin, M.S., Casais, R., Martín Alonso, J.M., Parra, F., 2000. ATP Binding and ATPase Activities Associated with Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2C-Like Polypeptide. *J. Virol.* 74, 10846–10851. doi:10.1128/JVI.74.22.10846-10851.2000
- Marques, R.M., Costa-E-Silva, A., Águas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G., 2012. Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 150, 181–188. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.038
- Martin-Alonso, A., Martín-Carrillo, N., García-Livia, K., Valladares, B., Foronda, P., 2016. Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent. *Infect. Genet. Evol.* 44, 46–50. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.034
- Martinez-Torrecuadrada, J.L., Cortes, E., Vela, C., Langeveld, J.P., Melen, R.H., Dalsgaard,

- K., Hamilton, W.D., Casal, J.I., 1998. Antigenic structure of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 8), 1901–1909.
- McColl, K.A., Morrissy, C.J., Collins, B.J., Westbury, H.A., 2002. Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus in decomposing rabbit carcasses. *Aust. Vet. J.* 80, 298–299.
- McColl, K. a, Merchant, J.C., Hardy, J., Cooke, B.D., Robinson, a, Westbury, H. a, 2002. Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiol. Infect.* 129, 655–63. doi:10.1017/s0950268802007756
- McIntosh, M.T., Behan, S.C., Mohamed, F.M., Lu, Z., Moran, K.E., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Ward, G.B., Botti, G., Capucci, L., Metwally, S.A., 2007. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol. J.* 4, 96. doi:10.1186/1743-422X-4-96
- McPhee, S.R., Butler, K.L., Kovaliski, J., Mutze, G., Capucci, L., Cooke, B.D., 2009. Antibody status and survival of Australian wild rabbits challenged with rabbit haemorrhagic disease virus. *Wildl. Res.* 36, 447–456. doi:10.1071/WR08137
- Medveczky, I., Kovacs, L., Kovacs, F.S., Papp, L., 1988. The role of the housefly, *Musca domestica*, in the spread of Aujeszky's disease (pseudorabies). *Med. Vet. Entomol.* 2, 81–86. doi:10.1111/j.1365-2915.1988.tb00052.x
- Merchán, T., Rocha, G., Alda, F., Silva, E., Thompson, G., de Trucios, S.H., Pagés, A., 2011. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Infect. Genet. Evol.* 11, 1469–1474. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.001
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J., Thumfart, J.O., 2000. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Genome Organization and Polyprotein Processing of a Calicivirus Studied after Transient Expression of cDNA Constructs. *Virology* 276, 349–363. doi:10.1006/viro.2000.0545
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.J., 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 184, 664–676. doi:10.1016/0042-6822(91)90436-F
- Mikami, O., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., Itakura, C., 1999. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res. Vet. Sci.* 66, 237–242. doi:10.1053/rvsc.1998.0266
- Miller, W.A., Koev, G., 2000. Synthesis of Subgenomic RNAs by Positive-Strand RNA Viruses. *Virology* 273, 1–8. doi:10.1006/viro.2000.0421
- Mitchell-Jones, A., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J., Vohralik, V., Zima, J., 1999. *The Atlas of European Mammals*. Acad. Press. London.
- Mitro, S., Krauss, H., 1993. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol* 9, 70–78.
- Monnerot, M., Vigne, J., Biju-Duval, C., Casane, D., Callou, C., Hardy, C., Mougél, F., Soriguer, R., Denneboug, N., Mounolou, J., 1994. Rabbit and man: genetic and historic approach. *enet. Sel. Evol.* 26, S167. doi:10.1186/1297-9686-26-S1-S167
- Montbrau, C., Padrell, M., Ruiz, M.C., 2012. Efficacy and safety of a new inactivated vaccine against the rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant (RHDV-2) 1984.
- Monterroso, P., Garrote, G., Serronha, A., Santos, E., Delibes-Mateos, M., Abrantes, J., Perez de Ayala, R., Silvestre, F., Carvalho, J., Vasco, I., Lopes, A.M., Maio, E., Magalhães, M.J.,

- Mills, L.S., Esteves, P.J., Simón, M.Á., Alves, P.C., 2016. Disease-mediated bottom-up regulation: An emergent virus affects a keystone prey, and alters the dynamics of trophic webs. *Sci. Rep.* 6, 36072. doi:10.1038/srep36072
- Moreno, S., Villafuerte, R., 1995. Traditional management of scrubland for the conservation of rabbits *Oryctolagus cuniculus* and their predators in Doñana National Park, Spain. *Biol. Conserv.* 73, 81–85. doi:10.1016/0006-3207(95)90069-1
- Morisse, J., Le Gall, G., Boilletot, E., 1991. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech* 10, 283–295.
- Muller, A., Freitas, J., Silva, E., Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Abrantes, J., Esteves, P.J., Alves, P.C., van der Loo, W., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Thompson, G., 2009. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 135, 368–373. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.057
- Mutze, G., Bird, P., Kovaliski, J., Peacock, D., Jennings, S., Cooke, B., 2002. Emerging epidemiological patterns in rabbit haemorrhagic disease, its interaction with myxomatosis, and their effects on rabbit populations in South Australia. *Wildl. Res.* 29, 577–590. doi:10.1071/WR00100
- Mutze, G., Cooke, B., Alexander, P., 1998. The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia. *J. Wildl. Dis.* 34, 221–227. doi:10.7589/0090-3558-34.2.221
- Neill, J., 1992. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequences. *Virus Res.* 24, 211–222.
- Neill, J.D., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L., 1991. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* 65, 5440–5447.
- Neves, B., n.d. O ordenamento e a gestão do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*). *Bol. Inf.*
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J.C., Dufour, B., Depaquit, J., 2011. Contribution to the knowledge of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitol. Res.* 108, 657–663. doi:10.1007/s00436-010-2110-9
- Nyström, K., Le Gall-Reculé, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoën-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A.M., Esteves, P.J., Strive, T., Marchandeau, S., Dell, A., Haslam, S.M., Le Pendu, J., 2011. Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog.* 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002188
- Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F., Thiel, H.-J., 1990. Identification and Characterization of the Virus Causing Rabbit Hemorrhagic Disease. *J. Virol.* 64, 3331–3336.
- OIE, 2016. Rabbit haemorrhagic disease, Finland [WWW Document]. URL http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=20200 (accessed 3.9.18).
- OIE, 2015a. OIE (World Organisation for Animal Health) technical disease cards [WWW Document]. URL <http://www.oie.int/animalhealth-%0Ain-the-world/technical-disease-cards/>
- OIE, 2015b. Rabbit haemorrhagic disease, in: OIE Terrestrial Manual.
- OIE, 2011. Rabbit haemorrhagic disease, immediate notification report Ref OIE = 10837. Itália.

- OIE Terrestrial Manual, 2016. Rabbit haemorrhagic disease.
- Park, N., Chong, C., Kim, J., Cho, S., Cha, Y., Jung, B., Kim, D., Yoon, J., 1987. An outbreak of viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) of rabbits in Korea. *J Korean Vet Med Assoc* 10, 409–422.
- Peel, A.J., Pulliam, J.R.C., Luis, A.D., Plowright, R.K., O’Shea, T.J., Hayman, D.T.S., Wood, J.L.N., Webb, C.T., Restif, O., 2014. The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild mammal populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132962–20132962. doi:10.1098/rspb.2013.2962
- Peleteiro, M.C., Ferreira da Silva, J., Dias-Pereira, P., Carvalho, T., Faustino, A., Correia, J., Pissarra, H., Stilwell, G., 2016. *Manual de Necrópsia Veterinária*, 1^a. ed. Lisboa.
- Power, M.E., Tilman, D., Estes, J.A., Menge, B.A., Bond, W.J., Mills, L.S., Daily, G., Castilla, J.C., Lubchenco, J., Paine, R.T., 1996. Challenges in the Quest for Keystones. *Bioscience* 46, 609–620. doi:10.2307/1312990
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M.K., 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* 68, 5117–5125. doi:0022-538X/94/\$04.00+0
- Pu, B.Q., Qian, N.H., Cui, S.J., 1985. Micro HA and HI tests for the detection of antibody titres to so called “hemorrhagic pneumonia” in rabbits - *Chin. Vet. Med.* 11, 16–17.
- Pu, B.Q., Xu, H.X., Zhou, T., 1984. Outbreak of a viral infectious disease in rabbits in Wuxi Prefecture. *Shanghai J. of Animal Husb. Vet. Med.* (in Chinese) 6, 15–16.
- Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrale, C., Scivoli, R., Botti, G., Ligios, C., Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Capucci, L., 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 44, 1–7. doi:10.1186/1297-9716-44-96
- Read, D., 1962. Notes on the life history of *Aleochara bilineata* (Gyll.)(Coleoptera: Staphylinidae), and on its potential value as a control agent for the cabbage maggot, *Hylemya*. *Can. Entomol.* 94.
- Rocha, G., Alda, F., Pagés, A., Merchán, T., 2017. Experimental transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) from rabbit to wild mice (*Mus spretus* and *Apodemus sylvaticus*) under laboratory conditions. *Infect. Genet. Evol.* 47, 94–98. doi:10.1016/j.meegid.2016.11.016
- Ruvoën-Clouet, N., Ganiere, J.P., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D., Le Pendu, J., 2000. Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family. *J. Virol.* 74, 11950–11954. doi:10.1128/JVI.74.24.11950-11954.2000
- Saunders, G., Cooke, B., McColl, K., Shine, R., Peacock, T., 2010. Modern approaches for the biological control of vertebrate pests: An Australian perspective. *Biol. Control* 52, 288–295. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.06.014
- Schirmeier, H., Granzow, H., Bergmann, I., Schliiter, H., 1990. Experimentelle Untersuchungen zur Hamorrhagischen Septikamie tier Kaninchen - *Mh. Vet. Med* 45, 193–197.
- Schwensow, N.I., Cooke, B., Kovaliski, J., Sinclair, R., Peacock, D., Fickel, J., Sommer, S., 2014. Rabbit haemorrhagic disease: Virus persistence and adaptation in Australia. *Evol. Appl.* 7, 1056–1067. doi:10.1111/eva.12195
- She, R., Chen, D.W., Gao, Q.Y., 1986. Observation on the ultrastructures of host cells in rabbit viral haemorrhagic disease. *Chinese J. Veferinary Med.* (in Chinese) 12, 2–4.

- Sheng, Y.X., Wang, Z.J., Xu, Y.F., 1985. Pathological studies on a viral septicaemia in rabbits. *Shanghai J. of Animal Husb. Vet. Med.* (in Chinese) 4, 3–6.
- Shien, J.H., Shieh, H.K., Lee, L.H., 2000. Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 68, 255–259. doi:10.1053/rvsc.1999.0372
- Sibilia, M., Boniotti, M.B., Angoscini, P., Capucci, L., Rossi, C., 1995. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* 69, 5812–5.
- Simón, M.C., Muguruza, R., Alonso, J.L., Muzquiz, J.L., Girones, O., Haffar, A., 1994. Recherche du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHD) chez le renard et rôle des canides domestiques dans la transmission de la maladie. *Rec. Med. Vet.* 170 841–845.
- Šmíd, B., Valíček, L., Rodák, L., Štěpánek, J., Jurák, E., 1991. Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 26, 77–85. doi:10.1016/0378-1135(91)90043-F
- Smith, A.T., Boyer, A.F., 2008. *Oryctolagus cuniculus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T41291A10415170. [WWW Document]. URL <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41291A10415170.en> (accessed 9.15.17).
- Smith, K.F., Sax, D.F., Lafferty, K.D., 2006. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conserv. Biol.* 20, 1349–1357. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00524.x
- Soriguer, R.C., 1980. y curva de crecimiento 7, 83–90.
- Steinhauer, D.A., Domingo, E., Holland, J.J., 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122, 281–288. doi:10.1016/0378-1119(92)90216-C
- Steinrigl, A., Revilla-Fernández, S., Eichinger, M., Koefer, J., Winter, P., 2010. Bluetongue virus RNA detection by RT-qPCR in blood samples of sheep vaccinated with a commercially available inactivated BTV-8 vaccine. *Vaccine* 28, 5573–5581. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.034
- Strive, T., Elsworth, P., Liu, J., Wright, J.D., Kovaliski, J., Capucci, L., 2013. The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal Rabbit Haemorrhagic Disease Virus infection which is not dependent on antibody titres. *Vet. Res.* 44, 1–11. doi:10.1186/1297-9716-44-51
- Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., Capucci, L., 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* 398, 125–134. doi:10.1016/j.virol.2009.11.045
- Strive, T., Wright, J.D., Robinson, A.J., 2009. Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384, 97–105. doi:10.1016/j.virol.2008.11.004
- Tablado, Z., Revilla, E., Palomares, F., 2009. Breeding like rabbits: Global patterns of variability and determinants of European wild rabbit reproduction. *Ecography (Cop.)*. 32, 310–320. doi:10.1111/j.1600-0587.2008.05532.x
- Tham, K.M., Barnes, S.M., Hunter, S.N., 1999. Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. *Virus Genes* 18, 235–42.

- The Mammal Society, 2015. Species Fact Sheet: Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*) 8023.
- Thompson, H.V., King, C.M., 1994. The European rabbit: the history and bioogy of a successful colonizer. Oxford Univ. Press. Oxford. United Kingdom.
- Thouvenin, E., Laurent, S., Madelaine, M.F., Rasschaert, D., Vautherot, J.F., Hewat, E. a, 1997. Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge. *J. Mol. Biol.* 270, 238–46. doi:10.1006/jmbi.1997.1095
- Trout, R.C., Tittensor, A.M., 1989. Can predators regulate wild Rabbit *Oryctolagus cuniculus* population density in England and Wales? *Mamm. Rev.* 19, 153–173.
- Tunon, M.J., Alvarez, M., Culebras, J.M., González-Gallego, J., 2009. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J. Gastroenterol.* 15, 3086–3098. doi:10.3748/wjg.15.3086
- Tunon, M.J., San Miguel, B., Crespo, I., Riezu-Boj, J.I., Larrea, E., Alvarez, M., Gonzalez, I., Bustos, M., Gonzalez-Gallego, J., Prieto, J., 2011. Cardiotrophin-1 Promotes a High Survival Rate in Rabbits with Lethal Fulminant Hepatitis of Viral Origin. *J. Virol.* 85, 13124–13132. doi:10.1128/JVI.05725-11
- Tunon, M.J., Sanchez-Campos, S., Garcia-Ferreras, J., Alvarez, M., Jorquera, F., Gonzalez-Gallego, J., 2003. Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J. Lab. Clin. Med.* 141, 272–278. doi:10.1067/mlc.2003.30
- United States Animal Health Association, 2008. Foreign animal diseases, 7th ed.
- Urakova, N., Frese, M., Hall, R.N., Liu, J., Matthaei, M., Strive, T., 2015. Expression and partial characterisation of rabbit haemorrhagic disease virus non-structural proteins. *Virology* 484, 69–79. doi:10.1016/j.virol.2015.05.004
- Valicek, L., Smid, B., Rodak, L., Kudrna, J., 1990. Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol* 112, 71–275.
- Valverde, J., 1967. Estructura de una Comunidad de Vertebrados Terrestres.
- Vazquez, A.L., Martin Alonso, J.M., Casais, R., Boga, J.A., Parra, F., 1998. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* 72, 2999–3004.
- Villafuerte, R., Calvete, C., Blanco, J.C., Lucientes, J., 1995. Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain, in: *Mammalia*. pp. 651–659.
- Villafuerte, R., Castro, F., Ramírez, E., Cotilla, I., Parra, F., Delibes-Mateos, M., Recuerda, P., Rouco, C., 2017. Large-scale assessment of myxomatosis prevalence in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) 60 years after first outbreak in Spain. *Res. Vet. Sci.* doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.014
- Villafuerte, R., Jordán, G., Angulo, E., 2000. Biología y factores de riesgo en el conejo silvestre, in: Rossell, J.M. (Ed.), *Enfermedades Del Conejo*. Mundi-Prensa, Barcelona, Spain, pp. 174–188.
- Villafuerte, R., Lazo, A., Moreno, S., 1997. Influence of food abundance and quality on rabbit fluctuations: Conservation and management implications in Donana National Park (SW Spain). *Rev. d'Ecologie (La Terre la Vie)* 52, 345–356.
- Virgós, E., Cabezas-Díaz, S., Lozano, J., 2005. El declive del conejo en España: evidencias a partir de las estadísticas de caza. *Quercus* 236, 16–20.
- Virgós, E., Cabezas-Díaz, S., Malo, A., Lozano, J., López-Huertas, D., 2003. Factors shaping European rabbit abundance in continuous and fragmented populations of central Spain.

- Acta Theriol. (Warsz). 48, 113–122. doi:10.1007/BF03194271
- Wang, E., Barrera, R., Boshell, J., Ferro, C., Freier, J.E., Navarro, J.C., Salas, R., Vasquez, C., Weaver, S.C., 1999. Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *J. Virol.* 73, 4266–71.
- Wang, Y.K., Sun, H.C., Zhou, Y.S., 1986a. Studies on susceptibility of laboratory animals to a new rabbit virus. *Chinese J. Rabbit Farming* (in Chinese) 2, 34.
- Wang, Y.K., Tian, H.F., Qian, Z., Chen, X.C., Yu, Y.H., 1986b. Studies on haemagglutination of a virus isolated from rabbit viral haemorrhagic disease. *Chinese J. Rabbit Fanning*, (in Chinese) 1, 41–43.
- Ward, D., 2005. Reversing Rabbit Decline: One of the biggest challenges for nature conservation in Spain and Portugal. SOSLynx.org.
- Wardhaugh, K., Rochester, W., 1996. Wardang Island. A retrospective analysis of weather conditions in relation to insect activity and displacement. Project CS 236. Australian & New Zealand Rabbit Calicivirus Disease Program – A Biological Control Initiative Against the European Wild Rabbit.
- Wei, J.S., Yu, N.S., Yang, Y.F., Zhang, X.S., Long, P.R., Shen, J., 1987. Investigation on a viral haemorrhagic disease in rabbits in Yunan Province. *Chinese J. Vet. Sci. Technol.* (in Chinese) 8, 20–24.
- Wells, K., Brook, B.W., Lacy, R.C., Mutze, G.J., Peacock, D.E., Sinclair, R.G., Schwensow, N., Cassey, P., O'Hara, R.B., Fordham, D.A., 2015. Timing and severity of immunizing diseases in rabbits is controlled by seasonal matching of host and pathogen dynamics. *J. R. Soc. Interface* 12, 20141184-. doi:10.1098/rsif.2014.1184
- Westcott, D.G., Frossard, J.-P., Everest, D., Dastjerdi, A., Duff, J.P., Choudhury, B., 2014. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Vet. Rec.* 174, 333.1-333. doi:10.1136/vr.g2345
- Wirblich, C., Meyers, G., Ohlinger, V.F., Capucci, L., Eskens, U., Haas, B., Thiel, H.J., 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.* 68, 5164–73.
- Wirblich, C., Thiel, H.J., Meyers, G., 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J. Virol.* 70, 7974–83. doi:10.1006/viro.2000.0579
- Xie, M.L., Cheng, C.P., Wei, H.J., Chen, K.Y., Yin, L.Y., 1986. Investigation on the infectious routes of rabbit plague. *Infect. Dis. Domest. Anim.* (in Chinese) 6, 4.
- Xu, F.N., Shen, W.P., Liu, S.J., 1985. Study of the pathology of viral haemorrhagic disease in rabbits. *Husbandry Vet. Med.* (in Chinese) 17, 153–155.
- Xu, H.X., Pu, B.Q., Shi, D.M., Fan, J.Z., 1985. Epidemiology of an infectious viral disease in rabbits in Wuxi County. *Shanghai J. of Animal Husb. Vet. Med.* (in Chinese) 3, 14–16.
- Xu, W., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech* 10: 393-408.
- Xu, Y.M., Wang, B.A., Wang, Y., 1986. Studies on the induction of disseminated intravascular coagulation by a rabbit viral haemorrhagic disease virus. *Chinese J. Rabbit Farming*, (in Chinese) 4, 36–38.
- Xu, Y.M., Wang, Y., Wang, B.A., 1985. Histopathological observation on a rabbit viral disease. *Chinese J. Rabbit Faming* (in chinese) 3, 39–40.

- Xu, Z.J., Chen, J.X., 1988. Studies on viral haemorrhagic syndrome in rabbits. *Acta Agric. Univ. Zhejiangensis* (in Chinese, with English Abstr. 14, 136–141.
- Xu, Z.J., Chen, W.X., 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: A review. *Vet. Res. Commun.* 13, 205–212. doi:10.1007/BF00142046
- Xu, Z.J., Chen, W.X., Chen, J.X., Yu, J.Y., 1985. Studies on control and prevention of a new rabbit 'disease. *Zhejiang J. of Animal Husb. Vet. Med.* (in chinese) 10, 12–13.
- Zofio, J.B., Vega, I., 2000. *El lince ibérico*. Editor. Debate S.a. WWF/Adena. Madrid.España.

Anexos

Anexo I – Apresentações orais por convite e publicações realizados no âmbito desta dissertação

Abade dos Santos, F.A., Carvalho, C., Nuno, O., Correia, J.J., Henriques, M., Peleteiro, M.C., Fevereiro, M., Duarte, M.D., 2017. Detection of rabbit Haemorrhagic disease virus 2 during the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) eradication from the Berlengas archipelago, Portugal. BMC Vet. Res. 13, 336. doi:10.1186/s12917-017-1257-3

Abade dos Santos, F.A. (2017). A doença hemorrágica viral do coelho-bravo. Edição de Maio. Disponível em <<http://www.veterinaria-atual.pt/na-pratica/doenca-haemorragica-viral-do-coelho-bravo/>>

Abade dos Santos, F.A. (2018). Caça menor - A doença hemorrágica viral do coelho-bravo. Edição 50, trimestral. Revista Turcaça.

Abade dos Santos, F.A. (2018). Recolha de sangue em coelho-bravo – Uma nova abordagem metodológica. Jornadas de Espécies Cigenéticas. Universidade de Évora.

Abade dos Santos, F.A. (2018). Coelho-bravo – Praga ou Extinção?. Ecossistemas Florestais, Conservação e Caça. Núcleo de Estudo e Proteção da Natureza. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Captura e sedação de coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus subsp. algirus*). 2018. Vídeo produzido no âmbito desta dissertação e do projeto +coelho. Disponível em <http://www.inia.pt/menu-de-topo/divulgacao/edicoes-proprias/videos-institucionais/captura-e-sedacao-de-coelho-bravo>

(Artigo em preparação) Blood collection from the external jugular vein of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*) under sedation with midazolam; handling considerations and risk factors.

Participação na Ação de formação colheita de material biológico no âmbito do plano de ação para o controlo da doença hemorrágica viral dos coelhos, 6 de Setembro, INIAV, Oeiras.

Anexo II – Sequências parciais obtidas de dois animais do subgrupo QP1

ID animal	Subgrupo	Sequência <i>primers 9+10</i>	Identidade por <i>BLAST</i>
M12 (fígado)	QP1	AGGCGCACCGGCGACATCAATGCTGAGGCCGGTTCAACTAATG GAACCCAGTACGGCGCGGGATCACAACCACTGCCGGTGACAGT TGGACTTTCACTGAACAATTACTCATCGGCACTTATGCCTGGGC AGTTCTTTGTTTGGCAGCTGAACTTCGCCTCCGGCTTCATGGAAC TTGGCTTGAGTGTGATGGGTACTTCTATGCGGGGACAGGGGCT TCAGCCACCCTCATTGACCTGTCAGAACTTGTTGACATCCGCCCT GTGGGACCCAGACCGTCCACAAGCACGCTTGTGTACAACTTGGG GGGCACAACCAGTGGCTTTTCCTATGTCTGA	Identidade 99% com a sequência MG763944.1
M18 (pulmão)	QP1	GCACCGGCGACATCAATGCTGAGGCCGGTTCAACTAATGGAACC CAGTACGGCGCGGGATCACAACCACTGCCGGTGACAGTTGGACT TTCCTGAACAATTACTCATCGGCACTTATGCCTGGGCAGTTCTT TGTTTGGCAGCTGAACTTCGCCTCCGGCTTCATGGAACCTGGCTT GAGTGTGATGGGTACTTCTATGCGGGGACAGGGGCTTCAGCCA CCCTCATTGACCTGTCAGAACTTGTTGACATCCGCCCTGTGGGA CCCAGACCGTCCACAAGCACGCTTGTGTACAACTTGGGGGGCAC AACCAGTGGCTTTTCCTATGTCTGA	Identidade 99% com a sequência MG763944.1

Anexo III – Aspeto macroscópico sugestivo de doença hemorrágica viral



Figura 1 – Hemorragia ocular e epistaxis (confirmado por RT-qPCR) (*Original do autor*).



Figura 2 – Palidez e diminuição da consistência hepática, lesões congestivo-hemorrágicas generalizadas no pulmão (*Original do autor*).

Anexo IV– Figuras dos espécimes positivos ao RT-qPCR para RHDV2



Figura 1 - Espécime da família Simuliidae
(Original de David Ramilo, 2018)



Figura 2 - Espécime do género Culicoides
(Original de David Ramilo, 2016)



Figura 3 - Espécime da subfamília
Forcipomyiinae (Original de David Ramilo,
2018)



Figura 4 - Espécime da família Staphylinidae
(Original de David Ramilo, 2018)